

**ORGANISATION UND EVOLUTION DES
MITOCHONDRIALEN GENOMS DER
SPALTHEFE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE**

**KLONIERUNG, SEQUENZIERUNG UND ANALYSE DER GENE FÜR DIE
KLEINE RIBOSOMALE RNA, APOCYTOCHROM b UND DIE ERSTE
UNTEREINHEIT DER CYTOCHROM-c-OXIDASE**

**Dissertation
der Fakultät für Biologie
durchgeführt am Institut für Genetik und Mikrobiologie
der LMU-München**

vorgelegt von

Helga Trinkl

München im Mai 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 1985

Auf Grund der Aktualität der Themen wurden Teile dieser Arbeit bereits veröffentlicht bzw. sind in Bearbeitung.

Trinkl, H., Lang, B.F., Wolf, K. (1985). The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: 7. Continuous gene for apocytochrome b in strain EF1 (CBS 356) and sequence variation in the region of intron insertion in strain *ade7-50h⁻*. Mol. Gen. Genet. 198, 360-363.

Trinkl, H., Lang, B.F., Wolf, K. (1985). Location and complete nucleotide sequence of the mitochondrial gene coding for the small rRNA of *Schizosaccharomyces pombe* strain *ade7-50h⁻*. In Vorb..

Trinkl, H., Wolf, K. (1985). Cytochrome oxidase subunit 1 gene of *Schizosaccharomyces pombe* strain EF1 (CBS 356): Two short optional introns, sequence variations and identical position of intron insertion. In Vorb..

	Seite
I. EINLEITUNG.....	01
II. MATERIAL UND METHODEN.....	12
1. Material.....	12
1.1. Abkürzungen.....	12
1.2. Genetische Nomenklatur.....	12
1.3. Radiochemikalien und Enzyme.....	13
1.4. Feinchemikalien.....	13
1.5. Medien und häufig verwendete Puffer.....	13
1.6. Stämme und Klone.....	14
2. Methoden.....	15
2.1. Präparation mitochondrialer DNA.....	15
2.2. Präparation mitochondrialer RNA.....	15
2.3. Plasmidpräparation.....	15
2.4. Restriktion und Gelelektrophorese von mt- und Plasmid-DNA.....	16
2.4.1. Restriktion (analytisch/präparativ).....	16
2.4.2. Gelelektrophorese in Agarose.....	16
2.4.3. Gelelektrophorese in Acrylamid.....	16
2.5. Qualitative und quantitative Bestimmung von RNA-Species.....	16
2.6. Reisolierung von DNA aus Agarose- bzw. Acrylamidgelen.....	17
2.7. Isolierung der kleinen ribosomalen RNA.....	17
2.8. Markierung von mt DNA durch "nick-translation".....	17

2.9. Markierung der kleinen ribosomalen RNA.....	17
2.10. Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozel- lulosepapier und Hybridisierung mit ^{32}P -DNA.....	18
2.11. Hybridisierung nitrozellulose-gebundener DNA- fragmente mit ^{32}P -RNA.....	18
2.12. Klonierung von mt DNA in Plasmide.....	18
2.13. Klonierung von mt DNA in M13-Phagen.....	18
2.14. Koloniehybridisierung und "dot-blot".....	18
2.15. Präparation einzelsträngiger Template-DNA.....	19
2.16. DNA-Sequenzanalyse nach der Maxam-Gilbert-Methode...	19
2.17. DNA-Sequenzanalyse nach der M13-Methode.....	19
2.18. S1-Nuklease-Kartierung.....	19

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....20

1. Lokalisierung und komplette Nucleotidsequenz

des mt Gens der kleinen rRNA (S rRNA) von *Schizosaccharomyces pombe* Stamm ade7-50h⁻ (50).....20

1.1. Kurze Einführung.....20

1.2. Erweiterung und Verfeinerung der Restriktionskarte...23

1.3. Feinkartierung des Gens der kleinen rRNA durch Hybridisierungsdaten.....25

1.4. Klonierung und DNA-Sequenz des mt Gens der kleinen rRNA und Bestimmung des 5' und 3'Endes durch S1-Nuclease-Kartierung.....29

1.5. Komplette Sekundärstruktur und Vergleich aus- gewählter Strukturen mit anderen Species.....32

2. Kontinuierliches Gen für Apocytochrom b (cob) im S. pombe Stamm EF1 (CBS 356) und Sequenzvariationen In der Region der Introninsertion im Stamm 50.....	39
2.1. Kurze Einführung.....	39
2.2. Verfeinerung der Restriktionskarte und Klonierung des relevanten Bereichs für das cob-Gen von EF1.....	42
2.3. Nucleotidsequenz des BamHI-Fragments.....	44
2.4. Hohe Homologie zwischen den cob-Genen der beiden Stämme.....	46
2.5. Gehäufte Basenaustausche im Bereich des Splicepunkts.....	47
3. Das Gen für die Untereinheit 1 der Cytochromoxidase (cox1) des S. pombe Stammes EF1 (CBS 356): Sequenzvariationen, optionale Introns und identische Introninsertionsstellen mit S. cerevisiae.....	53
3.1. Kurze Einführung.....	53
3.2. Restriktionskarte und Struktur des cox1-Gens von EF1 im Vergleich mit Stamm 50.....	56
3.3. Sequenzanalyse von cox1-Genbereichen.....	58
3.4. Bestimmung der Exon-Intron-Grenzen der optionalen Introns durch S1-Nuclease-Experimente.....	63
3.5. Eine 7 bp Insertion führt zu einem Rasterschub im ORF des Introns AI2 des cox1-Gens und Nucleo- tidvariationen in den Exonbereichen des cox1-Gens....	65

3.6. Besondere Merkmale der optionalen Introns (AI2a und AI3) des cox1-Gens von EF1: identische Inser- tionssites und Gruppe I-Klassifizierung.....	69
3.6.1. Allgemeine Bemerkungen.....	69
3.6.2. Optionales Intron AI2a.....	70
3.6.3. Optionales Intron AI3.....	77
3.7. Flankierende Exonregionen der beiden optionalen Introns.....	81
3.8. Abschließende Betrachtung.....	82
IV. ZUSAMMENFASSUNG.....	85
V. LITERATUR.....	88

I. EINLEITUNG

In zunehmendem Maße gewannen die Bemühungen der Biologie an Bedeutung, die sich mit der Analyse der Lebensvorgänge auf molekularer Ebene befaßten. Hierbei handelt es sich um Versuche, Einblicke in komplexe Zusammenhänge zu erhalten. Es wird daher verständlich, daß man zunächst bemüht war, möglichst einfache, modellhafte Systeme für Untersuchungen heranzuziehen. Systeme, die in ihrem Aufbau und in ihrer Funktion vergleichsweise einfach und überschaubar strukturiert sind, erlauben erste Anhaltspunkte für logische Zusammenhänge. Mit dem Wissen aus solchen Untersuchungen läßt sich dann auf komplexere Organisationsformen von Genomen rückschließen. Als ein sehr geeignetes Modellsystem bietet sich das kleine, mitochondriale Genom von Eukaryoten an. Im Gegensatz zum Genom des Kerns verfügt es nur über einen Bruchteil von dessen Codierungskapazität. Neben seiner Einfachheit besitzt es weitere Vorteile, sei es für Untersuchungen der Interaktionen zwischen Zellkern und Mitochondrium oder für die Klärung der Frage nach der Bedeutung von Mitochondrien für die Zelle. Eine allgemeine Kurzbeschreibung von Mitochondrien sei vorangestellt.

Es handelt sich um ovale Organellen (etwa 4-5 µm lang und 0,5-1 µm im Durchmesser), die eine Doppelmembran besitzen. Das Innere der Mitochondrien besteht aus einer flüssigen Matrix. Hier finden die Reaktionen des sog. "Citronensäurecyclus" und der Fettsäureoxidation statt. In der inneren Membran läuft der Vorgang der "oxidativen Phos-

phorylierung" ab, wobei ein Elektronenfluß über eine Kette von Atmungsenzymkomplexen erfolgt. Letztendlich wird molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert und ATP - d e r Energieträger der Zelle - wird gebildet.

Die Herkunft der Mitochondrien wird von vielen Autoren mit der Endosymbiontentheorie erklärt (Grivell, 1983), d.h. möglicherweise gab es vor langer Zeit fermentative Zellen, die beim allmählichen Übergang von anaerober zu aerober Atmosphäre überleben konnten, weil sie eine kleine, atmungsfähige Zelle aufnahmen. Diese kleine Zelle - so wird angenommen - war ein atmungsfähiger Prokaryot, der damit unserem heutigen Mitochondrium entspräche. Aus der Symbiose zwischen diesem Prokaryot und der Wirtszelle wurde im Laufe der Zeit das Zell-Organell-System der heutigen Eukaryoten, wobei das Mitochondrium jedoch nach und nach seine ursprüngliche Autonomie verloren hat.

Diese Teilautonomie spiegelt sich in der Codierungskapazität des mitochondrialen (meist circulären) Genoms wieder. Nur ein kleiner Teil (etwa 5%) der für ein funktionstüchtiges Mitochondrium wichtigen Proteine wird vom Mitochondrium selbst synthetisiert. In der Regel sind dies die Gene für die Atmungskettenproteine Apocytochrom b (cob), die Untereinheiten 1,2 und 3 der Cytochromoxidase (cox1,2 und cox3) und die Untereinheiten 6,8 und 9 der ATPase (oli1, oli2, aap1); weiterhin für das Translationssystem die Gene für die große rRNA (L rRNA), die kleine rRNA (S rRNA) und mindestens 22 tRNAs (Borst und Grivell, 1978; Tzagoloff et al., 1979).

Die Komponenten des Citronensäurecyclus und der Fettsäureoxidation werden nicht mitochondrial codiert, Diese, wie die übrigen mitochondrialen Proteine sind kerncodiert und werden in das Mitochondrium eingeschleust (Yaffe, 1983).

Obwohl die mitochondrialen Funktionen (wie z.B. die oxidative Phosphorylierung) und die Zusammensetzung mitochondrialer Gene in allen eukaryotischen Zellsystemen hoch konserviert sind, findet man überraschenderweise große Unterschiede hinsichtlich der mitochondrialen Genomlängen, der Genomorganisation und des Genaufbaus in verschiedenen Species, bzw. sogar innerhalb der Stämme einer Species. Die Längendifferenzen bewegen sich zwischen 100-2400 kbp in Pflanzenmitochondrien (Bendich, 1982; Wallace, 1982), über 18-100 kbp in mitochondrialen DNAs von Pilzen (Clark-Walker und Sriprakash, 1982), bis zu etwa 16 kbp bei Säugermitochondrien (Anderson et al., 1981; Bibb et al., 1981). Für diese Größenunterschiede lassen sich zwei Hauptursachen als Erklärung angeben, nämlich erstens das Auftreten von zusätzlichen DNA-Regionen und zweitens Verdoppelung (oder Vervielfachung) vorhandener DNA-Regionen. Das Auftreten zusätzlicher DNA-Regionen kann wiederum weiter aufgegliedert werden in zusätzliche DNA auf Grund von

- a) unterschiedlich langen Spacerbereichen (das sind AT-reiche Regionen nicht codierender Sequenzen zwischen den Genen)
- b) unterschiedlicher Anzahl an URFs (unassigned reading frames)



c) unterschiedlicher Anzahl an Introns (optionale Introns)

d) unterschiedlicher Anzahl von Genen auf dem mt Genom

Unterschiedlich lange Spacerbereiche können zu beträchtlichen Längendifferenzen zwischen mt Genomen verschiedener Species beitragen. Als Beispiel sei ein Vergleich der mt Genome von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und *Torulopsis glabrata* (*T. glabrata*) angeführt. Obwohl die Homologie zwischen den Genen der beiden Species sehr groß ist (etwa 80%) und im wesentlichen dieselbe Anzahl an Genen codiert wird, beträgt die Länge des mt Genoms von *T. glabrata* nur 18,9 kbp (Clark-Walker et al., 1981), im Gegensatz zu etwa 78 kbp bei *S. cerevisiae* (Borst und Grivell, 1981). Die mt Gene von *S. cerevisiae* werden durch lange AT-reiche Spacerbereiche getrennt (Borst und Grivell, 1981), die dem mt Genom von *T. glabrata* fehlen.

Weiterhin treten in verschiedenen Organismen sogenannte unassigned reading frames (URFs) in unterschiedlicher Zahl und Art auf. Man fand z.B. sieben URFs in der mitochondrialen DNA von Säugern (Anderson et al., 1981; Bibb et al., 1981), einen URF in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) (Lang et al., 1983), acht URFs in dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*) (Brown et al., 1983). Michael et al. (1984) konnten bei der Maus den Nachweis erbringen, daß solche URFs exprimiert werden.

Ein weiterer Grund, der sich auf die Länge mitochondrialer DNAs bzw. auf die Genomorganisation und den Genaufbau auswirkt, ist das Auftreten von Introns. Introns findet man

nicht in den mitochondrialen DNAs von Tieren, jedoch generell in mitochondrialen DNAs von Pilzen (Dujon, 1983; Sederoff, 1984). Die Zahl der Introns in verschiedenen Pilzspecies, selbst in verschiedenen Stämmen einer Species, ist variabel. In der Regel sind Intronhaltige Gene das cob-Gen, das L rRNA-Gen und das cox1-Gen (Clark-Walker, 1985). In der Hefe *S. cerevisiae* liegen beispielsweise diese drei Gene in Mosaikform vor. Stammabhängige Variationen in der Anzahl der Introns eines bestimmten Gens lassen sich beobachten. So enthält das cob-Gen in einigen *S.cerevisiae* Stämmen fünf Introns (den sog. "long"-Formen des Gens), während es im Stamm *S. carlsbergensis* (einer "short"-Form) nur 2 Introns enthält, die ersten drei Introns fehlen (Lazowska et al., 1980; Nobrega und Tzagoloff, 1980). Introns, die solche Polymorphismen verursachen, bezeichnet man auch als "optionale Introns" (Borst und Grivell, 1981). In letzter Zeit hat sich gezeigt, daß optionale Introns außer in *S. cerevisiae* auch in anderen Species, wie in *Neurospora crassa* (*N. crassa*) (Collins und Lambowitz, 1983; Burger und Werner, 1983), in *A. nidulans* (Waring et al., 1984) und in *S. pombe* (Trinkl et al., 1985), vorkommen.

Eine Erklärung für die Bedeutung der optionalen Introns steht noch aus.

Unterschiedliche Genomlängen auf Grund zusätzlicher DNA-Regionen können außerdem durch das Vorhandensein oder Fehlen von bestimmten Genen verursacht werden.

Beispielsweise wird das Gen für die Untereinheit 9 des ATPase-Komplexes bei *S. cerevisiae* und *S. pombe* mitochondrial codiert und exprimiert, bei *A. nidulans* und *N. crassa* mitochondrial codiert, aber nicht exprimiert und bei den Säugern weder mitochondrial codiert, noch exprimiert, sondern vom Kern codiert (Tzagoloff et al., 1979; Anderson et al., 1981; Clark-Walker, 1985).

Als zweite Hauptursache für mt Längendifferenzen wurde das Verdoppeln (bzw. Vervielfachen) vorhandener DNA-Regionen genannt. Hier kann man unterscheiden zwischen einer "internen" Amplifikation mt Gene und einer "externen" Amplifikation, d.h. einer Excision bestimmter mt DNA-Regionen und nachfolgender Amplifikation dieser Regionen. Letzteres trifft z.B. auf die seneszenten plasmidähnlichen DNAs von *Podospora anserina* zu (Wright et al., 1982; Esser et al., 1980; Belcour et al., 1981). Als Beispiel für den ersten Fall wäre das mt Genom von *A. nidulans* zu nennen. Hier fand man, daß zwei tRNA-Gene (die tRNAs für Cystein und Asparagin) in duplizierten Kopien auf dem Genom vorhanden sind, jeweils von circa 8 kbp getrennt (Brown et al., 1985). Das hier im allgemeinen angedeutete Problem der extremen Variation der mitochondrialen Genome läßt sich außerordentlich gut an der Spalthefe *S. pombe* untersuchen. Betrachtet man die mitochondrialen Genomlängen von Pilzen (18- über 100 kbp) allgemein (Clark-Walker und Sriprakash, 1982), so liegt *S. pombe* am unteren Ende der Skala. *S. pombe* Stämme haben

eine Länge von 17,4 kbp (Stamm EF1 (CBS 356) bis maximal etwa 23 kbp (Stamm EF2). Sie liegen damit größenordnungsmäßig im Bereich der mitochondrialen DNA von Säugern (Anderson et al., 1981; Bibb et al., 1981), zeigen jedoch eine völlig andere Organisationsform als diese, denn sie besitzen trotz ihrer Kürze beispielsweise Introns und intergene Spacerregionen. Zwei der *S. pombe* Stämme sind sehr gut untersucht, nämlich der Stamm *ade7-50h⁻* (50) und der Stamm EF1 (CBS 356). Für den Stamm 50 liegt mittlerweile die komplette Nucleotidsequenz vor (Lang et al. 1983; Lang, 1984; Lang et al., 1985; Trinkl et al., in Vorb.; B.F. Lang, unveröff. Daten). Die Genkarte und die Restriktionskarte von Stamm 50 ist in Abb.1 und Abb.2 zu sehen.

Das mitochondriale Genom dieses Stammes ist circa 19,4 kbp lang (Lang und Wolf, 1984), während es im nahe verwandten Stamm EF1 mit 17,6 kbp (Zimmer et al., 1984; Trinkl und Wolf, in Vorb.) beträchtlich kürzer ist.

Von Interesse war vor allem, wodurch diese Einsparung von fast 2 kbp, also etwa 10% des mitochondrialen Genoms, verursacht wurde. Gibt es verkürzte intergene Spacerregionen, fehlen Genbereiche, URFs, oder sind optionale Introns für den Längenunterschied verantwortlich zu machen.

Möglicherweise sind fehlende optionale Introns in den Kern gewandert, zu Zeiten, als das Organell von der Symbiose mit der Wirtszelle (gemäß der Endosymbiontentheorie) zur Abhängigkeit überging. Die Untersuchung solcher Phänomene läßt somit Schlüsse auf den evolutionären Weg des mitochondrialen

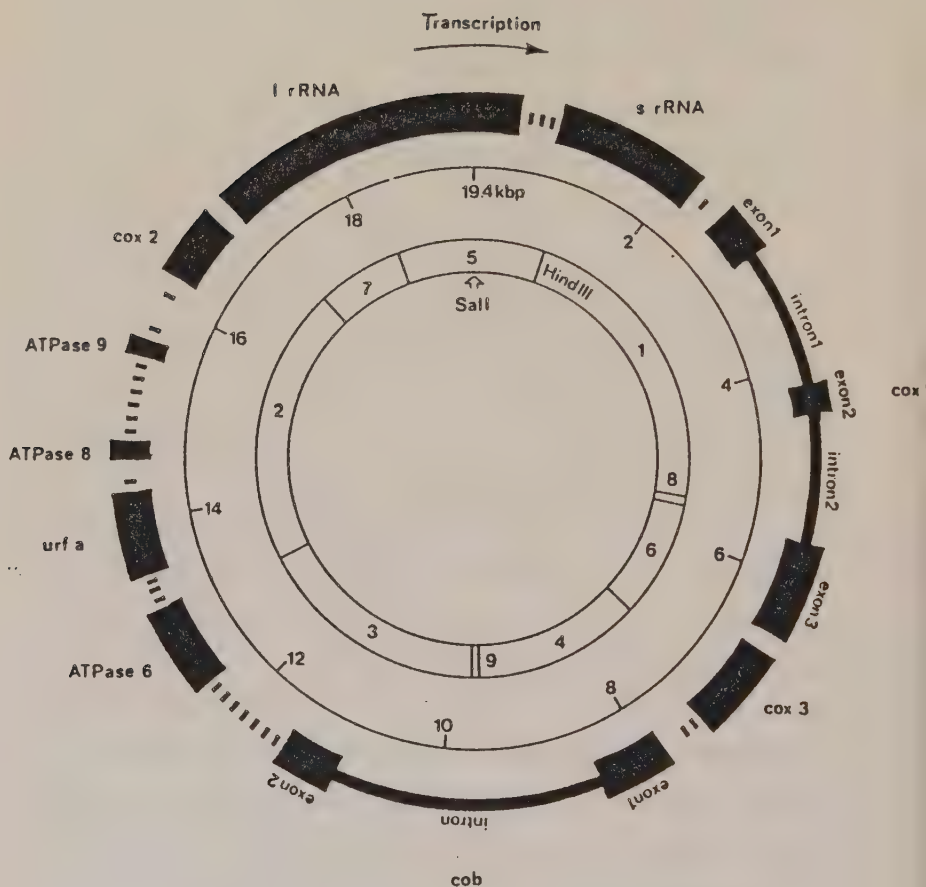


Abb.1: Physische Karte des mitochondrialen Genoms von *S. pombe* Stamm 50. Die Größe des Genoms ist 19,4 kbp. Der äußere Kreis zeigt die Lokalisierung der Gene; dicke Balken zeigen die Strukturgenbereiche an, dünne Balken Introns. Die tRNAs erscheinen als kleine Rechtecke. Als Anhaltspunkte sind die Sall-Schnittstelle und die HindIII-Restriktionskarte eingezeichnet. Die Daten stammen von Lang et al. (1983), Lang und Wolf (1984) und B.F. Lang, unveröff. Daten.

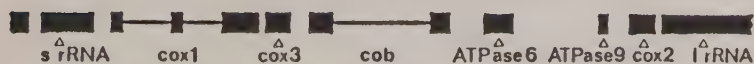
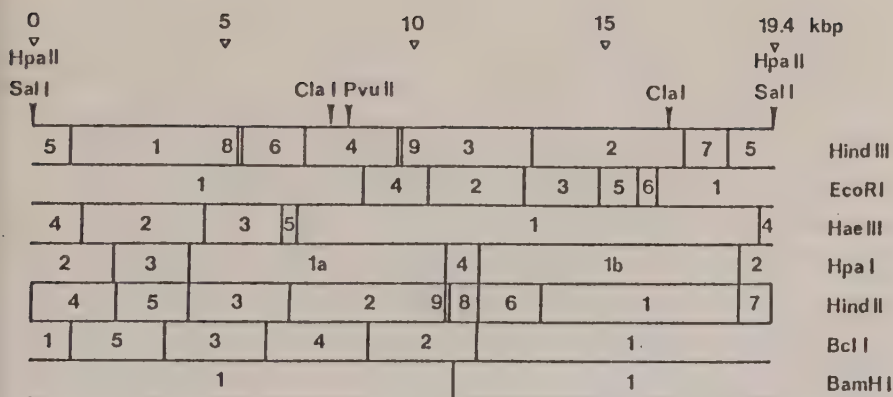


Abb.2: Restriktionskarte des mitochondrialen Genoms von *S. pombe* Stamm 50 (Daten entnommen aus Lang und Wolf, 1984).

Genoms zu. Sind z.B. Introns verschiedener Species hoch homolog, so kann dies auf eine Parallelevolution hinweisen oder aber auf einen horizontalen Gentransfer (der Ähnlichkeiten mit transponablen Elementen aufzeigt) mit anschließender divergenter Entwicklung (Hensgens et al., 1983).

Ein Grund für diese ausgeprägte Diversität der mitochondrialen Genome von Pilzen, im Gegensatz zu den relativ geringen Variationen bezüglich Größe und Organisation bei den mitochondrialen DNAs der Säuger, mag in der Tatsache liegen, daß es bei den Säugern zu keiner Rekombination zwischen den mt Genomen kommen kann. Aus Gründen, wie der unverhältnismäßig hohen Anzahl an Mitochondrien in der Eizelle im Vergleich zum Spermium und damit der höheren Wahrscheinlichkeit des Verlusts durch Gendrift, oder Abbau paternalen mt Genome in der Zygote, wird bei Säugern ein Rekombinationsmechanismus erschwert bzw. verhindert (Birky et al., 1982). Barrieren dieser Art bestehen bei den mt Genomen der Pilze nicht. Mechanismen, wie Rekombination, oder auch horizontaler Gentransfer tragen sicher zu der enormen Variationsbreite der mitochondrialen Genome von Pilzen bei.

Trotz aller Vielfalt findet man jedoch auch sehr konstante Elemente im mitochondrialen Genom; So z.B. das Gen der kleinen rRNA (5S rRNA). Dieses Gen erwies sich, besonders hinsichtlich seiner Sekundärstruktur, zwischen den verschiedenen Species und Stämmen als äußerst konstant. Es schien geeignet zu der Lösung evolutionärer Fragestellungen beizutragen und phylogenetische Zusammenhänge aufzuzeigen, da es

ubiquitär vorkommt und von praktikabler Länge ist. Basierend auf der eingangs erwähnten Endosymbiontentheorie, hoffte man Hinweise auf einen monophyletischen Ursprung der Mitochondrien zu erhalten, bzw. den Grad der Abweichungen verschiedener Species als Maßstab für phylogenetische Beziehungen benutzen zu können. Neben diesem evolutionären Aspekt ist die Frage nach der Topologie und Funktion des mitochondrialen Ribosoms nicht minder von Bedeutung. Zum besseren Verständnis dieser Anliegen konnte die Untersuchung des Gens der S rRNA des *S. pombe* Stammes 50 wichtige Ergebnisse beibringen, da es sich hierbei um ein extrem kleines Gen handelt, verglichen mit den S rRNA-Genen anderer Species. Somit konnten die minimalen Anforderungen an dieses Molekül gut untersucht werden.

Abschließend ein kurzer Hinweis zum Aufbau dieser Arbeit. Das Kapitel III ist in drei Teile untergliedert, die je einem bestimmten Problemkreis zugeordnet sind. Dem besseren Verständnis und der Übersichtlichkeit wegen, wird in jedem Teil an die Darstellung der Ergebnisse die Diskussion anschließen.

11. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Abkürzungen

amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
CAP	Chloramphenicol
CsCl	Cäsiumchlorid
dA(G,T,C,U)TP	Desoxy-adenosin(-guanin,-thymin,-cytosin,-uridin)5'-triphosphat
DBM	Diazobenzylloxymethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Kbp	Kilobasenpaare
LB	Luria-Broth
M	Mol
mm	Millimol
mt	mitochondrial
n	nucleär
o.D.	optische Dichte
P	Phosphatgruppe
PSD	Diethylpyrrocarbonat
rpm	Umdrehungen pro Minute
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
tRNA	transfer Ribonucleinsäure
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeff.)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
TE	Tris-EDTA
TEB	Tris-EDTA-Borat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TyKPI	Trypton-Yeast-Kaliumphosphat
U	Enzymeinheit (Unit)
UE	Untereinheit
wt	Wildtyp

1.2. Genetische Nomenklatur

aap1	ATPase Untereinheit 8
cob	Apocytochrom b
cox1 (=oxi3)	Cytochromoxidase Untereinheit 1
cox2 (=oxi1)	Cytochromoxidase Untereinheit 2
cox3 (=oxi2)	Cytochromoxidase Untereinheit 3
L rRNA	große ribosomale Ribonucleinsäure
oli1	ATPase Untereinheit 9
oli2	ATPase Untereinheit 6
S rRNA	kleine ribosomale Ribonucleinsäure
var1	Ribosomen-assoziiertes Protein

1.3. Radiochemikalien und Enzyme

Radiochemikalien	Amersham-Buchler, Braunschweig New England Nuclear, Dreieich
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim Biolabs, New England, USA BRL, Maryland, USA
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Polynucleotidkinase	Boehringer, Mannheim
DNA-Polymerase I	Boehringer, Mannheim
S1-Nuclease	Boehringer, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Biolabs, New England, USA
T4 DNA-Kinase	BRL, Maryland, USA

1.4. Feinchemikalien

Alle Chemikalien waren von dem höchsten verfügbaren Reinheitsgrad. Sie wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Hedinger, Stuttgart
Agarose	BRL, Maryland, USA
Agfapan 100 Film	Agfa Gevaert, Leverkusen
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bisbenzimid	Riedel de Haen, Seelze
CAP	Bayer, Leverkusen
Cäsiumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Curix MR 600	Agfa Gevaert, Leverkusen
DMS	Fluka AG, Buchs, Schweiz
DNA aus Heringssperma	Sigma, St.Louis, USA
EB	Sigma, St.Louis, USA
EDTA	Baker Chemicals, Deventer, NL
Ficoll	Sigma, St.Louis, USA
Formamid	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Glucose	Hedinger, Stuttgart
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Mutanase	Novo Industries, Kopenhagen, DK
Natriumcitrat	Baker Chemicals, Deventer, NL
Nitrozellulose	Schleicher und Schüll, Dassel
PSD	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Sarcosyl	Ciba Geigy, Basel, CH
SDS	Serva, Heidelberg
Tris	Sigma, St.Louis, USA
Trypton	Difco, Detroit, USA
tRNA aus E.coli	Boehringer, Mannheim
X-Gal	Serva, Heidelberg

1.5. Medien und häufig verwendete Puffer

LB-Medium	Bacto-Trypton	10g
	Hefeextrakt	5g
	NaCl	0,5g
	NaOH (2M)	1ml
	Glucose (50%)	4ml
	H ₂ O	ad 1l
	Glucose wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.	

TyPKI-Medium	Trypton	10g
	Hefeextrakt	5g
	K ₂ HPO ₄	1,15g
	H ₂ O	ad 1l
TE-Puffer	Tris	10mM
	EDTA	1mM
	pH	8
TEB-Puffer	Tris	1,8M
	EDTA	70mM
	pH	8,3
	mit Borsäure eingestellt	
Sorbitolpuffer	Sorbitol	0,75M
	EDTA	5mM
	pH	5,6

1.6. Stämme und Klone

Verwendet wurden:

Die Schizosaccharomyces-Stämme:

- ade7-50h⁻ U.Leupold, Bern
- EF1 (CBS 356) H.Gutz, Braunschweig

Die Bakterienstämme:

- E.coli HB 101 recA⁻,rk⁻,mk⁻ H.W.Boyer,
San Francisco
- JM 101 lac⁻,pro⁻ J.Messing, St.Paul,
(F⁺,pro⁺) Univ. of Minnesota

Die Klone für Maxam-Gilbert-Sequenzierung

(Vektoren: pBR 322, pACYC 184 oder pDB 262):

- | | | |
|---------------|---|--------------------------------------|
| | Insert: | Herkunft: |
| - pFM 111-2 | HindIII-1-Fragment
aus ade7-50h ⁻ | H.Trinkl, München |
| - pFM 25 | HindIII-5-Fragment
aus ade7-50h ⁻ | B.F.Lang, München |
| - TPM 2 und 3 | BamHI-3-Fragment
aus EF1 | Im Verlauf der
Arbeit hergestellt |
| - TPM 6 | HindIII-4-Fragment
aus EF1 | " " |
| - TPM 102 | HindIII-1-Fragment
aus EF1 | " " |
| - TPM 27 | EcoRI-4-Fragment
aus EF1 | " " |

Die Klone für M13-Sequenzierung

(Vektoren: M13mp8 und M13mp9):

- | | | | |
|---------|--------------------------------|---|---|
| - HTM 4 | EcoRV-ClaI-Fragment
aus EF1 | " | " |
| - HTM 5 | ClaI-EcoRV-Fragment
aus EF1 | " | " |

- HTM 10	HaeIII-HaeIII-Fragm. aus EF1	"	"
- HTM 20	HpaI-PvuII-Fragment aus EF1	"	"
- HTM 30	PvuII-HpaI-Fragment aus EF1	"	"
- HTM 600	HaeIII-HindIII-Fragm. aus EF1	"	"

2. Methoden

2.1. Präparation mitochondrialer DNA

Die Hefezellen wurden unter Schütteln bis zur stationären Phase in einem Medium, das 2% Hefeextrakt, 1% Ethanol und 3% Glycerin enthielt, gezüchtet. Sie wurden dann kurz abgeschleudert, in frischem Medium resuspendiert und erneut abzentrifugiert (wenn etwa 70-80% der Zellen Teilungsstriche zeigten). Die Protoplastierung erfolgte mit Novozym bei 30°C (etwa 1 h). Durch Schütteln mit Glasperlen wurden die Mitochondrien aus den Protoplasten freigesetzt. Nach Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte die Pelletierung der Mitochondrien. Zur Reinigung wurden sie auf einen Glycerinstufengradienten (40% : 80%) geschichtet und 30 min. bei 23000 rpm (5°C) zentrifugiert. Die Mitochondrien erschienen als bräunliche Bande an der Grenzschicht, wurden abgenommen und mit 2% SDS lysiert. Zur Reinigung der DNA von Protein schlossen 2-3 Phenol-Chloroform-Extraktionen an. Nach Ethanolpräzipitation erfolgte die Isolierung der DNA durch eine Ultrazentrifugation in CsCl (1,1g/ml TE) unter Zugabe von 1,5µg/ml Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (2 Tage, 20°C, 40000 rpm). Auf Grund ihrer Fluoreszenz im UV-Licht kann die DNA-Bande abgenommen werden.

2.2. Präparation mitochondrialer RNA

Diese erfolgte im wesentlichen ähnlich der Präparation mitochondrialer DNA, jedoch muß auf das häufige Vorkommen von RNasen geachtet werden, insbesondere ab der Lyse der Mitochondrien, bei der die RNA "frei" wird (sterile Geräte, Zugabe von 0,001% PSD zu den Puffern). Die Lyse der Mitochondrien erfolgte mit Lyse-Mix (4% SDS, 1% TPNS, 0,5% PAS, 8% Butanol-2, 7M Harnstoff). Nicht nötig waren hier die Extraktionsschritte mit Phenol. Die mitochondriale RNA wurde isoliert durch eine Ultrazentrifugation in CsCl (1,0g/ml TE) unter Zugabe von 1,5µg/ml Ethidiumbromid (20°C, 40000 rpm, ü.N.). Im UV-Licht ließ sich aufgrund der Ethidiumbromid-Anfärbung die RNA als kompaktes Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens erkennen.

2.3. Plasmidpräparation

Sie erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Clewell (1972). Anzucht der Zellen bis zur stationären Phase wurde in TyPKI-Medium durchgeführt. Nach Abschleudern (5 min.,

12000 rpm) wurde das Pellet in 25% Sucrose, 50mM Tris pH 8 suspendiert. Erneut wurde abgeschleudert (3 min., 15000 rpm) das Naßgewicht bestimmt und suspendiert in TES (50mM Tris, 5mM EDTA, 50mM NaCl; pH 8). Lyse der Zellen erfolgte mit Lysozym und Lyse-Mix. Zum Abtrennen der chromosomalen DNA wurde 30-60 min. bei 20000 rpm abgeschleudert. Der Überstand wurde abdekantiert und einer dreimaligen Phenol-Chloroform-extraktion zum Beseitigen von Proteinen unterworfen. Zur Reinigung der DNA wurde ein CsCl-Gradient (1,1g/ml TE) gefahren unter Zugabe von 2µg/ml Bisbenzimid (40000 rpm, 32-48 h). Im UV-Licht wurde die fluoreszierende DNA-Bande abgenommen. Um das Insert aus dem Plasmid zu erhalten, wurde ein präparativer Restriktionsschnitt durchgeführt. Die Abtrennung von Plasmid- und Insertanteil erfolgte in der Regel durch einen zweiten CsCl-Bis-Gradienten, ließ sich in manchen Fällen jedoch auch durch eine Auftrennung in einem 6% Acrylamidgel bewerkstelligen.

2.4. Restriktion und Gelelektrophorese von mt und Plasmid-DNA

2.4.1. Restriktion (analytisch/präparativ)

Mitochondriale bzw. Plasmid-DNA wurde nach Angaben der Hersteller mit Restriktionsenzymen verdaut. Das Endvolumen des Ansatzes war bei analytischen Schnitten etwa 10µl, bei präparativen Schnitten 200-500µl (Faustregel: 0,5µg DNA = 1µl).

2.4.2. Gelelektrophorese in Agarose

Für die Auftrennung der Restriktionsfragmente aus analytischen Schnitten wurden ausschließlich horizontale, 1%-ige Agarosegele verwendet. Anfärbung der DNA-Banden erfolgte mit Ethidiumbromid. Zur Längenbestimmung wurden Eichmarker co-elektrophoretisiert.

2.4.3. Gelelektrophorese in Acrylamid

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente aus präparativen Schnitten wurde in vertikalen, 6%-igen Acrylamidgelen durchgeführt. Nach Auftragen der Proben wurde zunächst ü.N. eine Spannung von 50V angelegt (zum Sammeln und langsamen Hineinlaufen der Proben), dann auf 300V erhöht. Die Laufdauer hing von der Größe der Fragmente ab (z.B. 3 h für Fragmente von 200-1000bp Länge).

2.5. Qualitative und quantitative Bestimmung von RNA-Species

Zur Auftrennung und zur Mengenbestimmung von mt RNA-Species wurde die RNA auf 1,5%-ige, vertikale Agaroseplattengele (Locker et. al., 1979) gegeben, die zur Denaturierung der RNA 6M Harnstoff enthielten. Dieses System erwies sich als vorteilhaft, da das Gel durch die zwei Glasplatten vor Kontamination von außen mit RNasen geschützt war. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei etwa 150-200mA für 2-3 h im Kühlraum.

2.6. Reisolierung von DNA aus Agarose- bzw. Acrylamidgelen

Für weitere Untersuchungen von DNA-Fragmenten (z.B. radioaktive Markierung, Nachschneiden mit Restriktionsenzymen, Strangtrennung) wurden diese elektrophoretisch aus dem Gel eluiert. Zu diesem Zwecke wurden die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Banden in Dialyseschläuche gegeben, die mit TE gefüllt wurden. Die Dauer der Elektroelution war abhängig von der Größe der zu eluierenden Fragmente. Die angelegte Spannung betrug 50V-maximal 100V. Die eluierte DNA wurde ethanolpräzipitiert und in getrocknetem Zustand aufbewahrt.

2.7. Isolierung der kleinen ribosomalen RNA

Gesamt-mt RNA wurde aus *Schizosaccharomyces pombe* ade7-50h⁻ präpariert und auf einem vertikalen, 1,5%-igen Agarose-Harnstoffgel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte 4-5 h lang bei 150V und 4°C. Nach Anfärben mit 1,5µg/ml Ethidiumbromid wurde die Bande für die kleine ribosomale RNA herausgeschnitten und aus dem Gel reisoliert (vgl. Kap. 2.6.).

2.8. Markierung von mt DNA durch "nick-translation"

Die von Rigby et al. (1977) beschriebene Methode wurde in einigen Punkten variiert. Eine Endonucleasebehandlung der DNA war nicht nötig, da die verwendete DNA durch die Präparation selbst Einzelstrangbrüche aufweist und zudem die DNA-Polymerase I eine Endonucleaseaktivität enthält. Die Inkubationsdauer betrug 3-maximal 4 h bei 18°C. Die Abtrennung der nicht eingebauten, radioaktiven Triphosphate erfolgte mit einer Ethanolpräzipitation, wobei diese Triphosphate im Überstand zurückbleiben. Bei allen radioaktiven Markierungen mit ³²P wurde der Einbau von ³²P-dATP durch Messung der Cerenkow-Strahlung im Tritiumkanal eines Szintillationszählers bestimmt.

2.9. Markierung der kleinen ribosomalen RNA

Die 5'Endmarkierung der kleinen rRNA mit γ -³²P-ATP wurde im wesentlichen nach der Prozedur von Goldbach et al. (1977) durchgeführt. Zur alkalischen Fragmentierung wurde die gefällte und getrocknete RNA in frischer 0,05M Na₂CO₃-Lösung resuspendiert und bei 50°C 80 min. lang inkubiert. Nach Neutralisierung und Überführung in den entsprechenden Kinasepuffer wurden 1U T4-Kinase und 20uCi γ -³²P-ATP hinzugegeben. Inkubationszeit 30 min. bei 37°C. Die nächsten Schritte wurden modifiziert. Der Ansatz wurde mit 100µg/ml Proteinase K 4h bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluß daran phenolisiert. Die Abtrennung der nicht eingebauten, radioaktiven Triphosphate erfolgte durch Ethanolpräzipitation, wobei der größte Anteil der Triphosphate im Überstand verbleibt.

2.10. Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosepapier und Hybridisierung mit ^{32}P -DNA

Das "Blotting" von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter, sowie die Hybridisierung der auf den Nitrozellulosefilter gebundenen und denaturierten DNA mit nick-translatierter ^{32}P -DNA, erfolgte nach der Vorschrift von Southern (1975). Abweichend von dieser Methode wurde die radioaktiv markierte DNA vor der Hybridisierung 30 min. in 95%-igem Formamid und 10mM NaOH bei 80°C inkubiert, um die Doppelstränge besser aufzutrennen. Zum Sichtbarmachen der Signale wurden die Nitrozellulosefilter autoradiographiert.

2.11. Hybridisierung nitrozellulose-gebundener DNA-Fragmente mit ^{32}P -RNA

Hierbei wurde in Anlehnung an die Southernmethode (Southern, 1975) vorgegangen. Die Behandlung der Nitrozelluloseblots mit den gebundenen DNA-Restriktionsfragmenten erfolgte zunächst wie angegeben. Als Hybridisierungslösung (50% deionisiertes Formamid; 5x SSC; 50mM Na-phosphat; 0,2% SDS; 0,02% Denhardts-Lösung und 50µg/ml frisch aufgekochte Heringssperma-DNA) wurde jedoch die bei der Northern-Prozedur (Ailwine et al., 1977) aufgeführte, benutzt. Die Inkubationstemperatur betrug 40°C und die Dauer 2 Tage. Gewaschen wurden die Filter mit DBM-Waschlösung (5x SSC; 30% Formamid; 0,1% SDS), wieder in Anlehnung an die Northern-Methode. Nach Trocknen wurden die Filter eingeschweißt und autoradiographiert.

2.12. Klonierung von mt DNA in Plasmide

Die Klonierung erfolgte nach Standardprozeduren, wie sie die Hersteller empfehlen. Als Vektoren dienten pBR 322 (Bollivar et al., 1977), pACYC 184 (Chang und Cohen, 1978) und pDB 262 (Beach und Nurse, 1982). Ligiert wurden die beiden DNAs mit T4-DNA-Ligase ü.N. bei RT. Die Transformation fand mit kompetenten Zellen des Empfängerstamms E.coli HB 101 statt. Kompetenz der Zellen wurde durch Behandlung mit 0,1M CaCl_2 erreicht.

2.13. Klonierung von mt DNA in M13-Phagen

Die Ligation wird, wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben, ausgeführt. Als Vektoren dienten M13mp8 und M13mp9 (Messing, 1983). Ligiert wurden die beiden DNAs mit T4-Ligase ü.N. bei 15°C. Die Transformation fand mit kompetenten Zellen des Empfängerstamms E.coli JM 101 statt. Kompetenz der Zellen wurde durch 0,1M CaCl_2 -Behandlung erreicht.

2.14. Koloniehybridisierung und "dot-blot"

Die Koloniehybridisierung erfolgte im wesentlichen nach der Arbeit von Grunstein et al. (1975). Die Methode des "dot-blot" ist ein sehr einfaches und schnelles Verfahren zum Nachweis von positiven Klonen. Etwa

0,5µg einer doppelsträngigen DNA oder einzelsträngigen M13-Template-DNA wurde auf ein Nitrozellulosefilter aufgetropft und 2h bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung dieser Filter erfolgte analog Kapitel 2.10..

2.15. Präparation einzelsträngiger Template-DNA

Dieses Verfahren wurde von Messing (1983) beschrieben.

2.16. DNA-Sequenzanalyse nach der Maxam-Gilbert-Methode

Das nach Kapitel 2.6. Isolierte doppelsträngige DNA-Fragment wurde vor der Markierung zur Reinigung von Acrylamid phenolisiert. Die Markierungsformen hingen von der Art der Fragestellung und der Sequenz der Schnittstellen der Restriktionsenzyme ab. Die verschiedenen Prozeduren hierzu, sowie die der Strangtrennung und der chemischen Degradation, wurden der Anleitung von Maxam und Gilbert (1980) entnommen. Zusätzlich fand eine Markierungsmethode mit $\alpha^{32}\text{P}$ -Cordycepin-5'-triphosphat, beschrieben von Tu und Cohen (1980), Anwendung. Die Auftrennung der Banden fand in vertikalen Polyacrylamidgelen (0,3x60x20 cm) verschiedener Acrylamidkonzentrationen (4-20%) statt, die entsprechend der Anleitung von Garoff und Ansorge (1981) hergestellt wurden.

2.17. DNA-Sequenzanalyse nach der M13-Methode

Die Sequenzierung des nach Kapitel 2.13. einklonierten DNA-Fragments wurde entsprechend der "Didesoxy-Kettenabbruch-Methode" nach Sanger et al. (1977) durchgeführt. Für das Annealing wurde als Primer ein synthetisches, einzelsträngiges Pentadecamer verwendet. Der Reaktionsansatz (Messing, 1983) wurde mit einer ausgezogenen Glaskapillare aufgenommen, deren beide Enden zugeschweißt wurden. Nach kurzem Erhitzen auf 100°C kühlten die Proben ü.N. ab. Die Markierung mit $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP wurde entsprechend der Anleitung von Messing (1983) durchgeführt. Die Auftrennung der Banden erfolgte - wie in Kapitel 2.16. beschrieben - in vertikalen Polyacrylamidgelen.

2.18. S1-Nuclease-Kartierung

Hierbei wurde, wie in der Arbeit von Bonitz et al. (1982) beschrieben, vorgegangen.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Lokalisierung und komplette Nucleotidsequenz des mt Gens der kleinen rRNA von *S. pombe* Stamm ade7-50h⁻ (50)

1.1. Kurze Einführung

Ein Hauptanliegen der biologischen Wissenschaften war seit langem der Wunsch Informationen über phylogenetische Beziehungen zwischen Lebewesen zu gewinnen, der Wunsch evolutionäre Schritte nachzuvollziehen. Die Erfassung der prokaryotischen und frühen eukaryotischen Evolution war - mangels fossiler Hinweise - mit Schwierigkeiten behaftet. Zunächst versuchte man mit Hilfe von in der Evolution hoch konservierten Proteinen aussagefähige Informationen zu erhalten. Über Sequenzvergleiche und spezifische Auswertungsprogramme wurden "Stammbäume" für Beziehungen zwischen verschiedenen Organismen aufgestellt, beispielsweise an Hand von c-Typ Cytochrom Sequenzen, von Bakterien-Ferredoxinen, von Dihydrofolat Reduktasen oder von ATPase Untereinheiten (George et al., 1983). Man stellte eine hohe Übereinstimmung der so erhaltenen verschiedenen Stammbäume fest und konnte damit Hypothesen über die Evolution der Organismen aufstellen (Dayhoff und Schwartz, 1981). Auch die 5S rRNA wurde für vergleichende Untersuchungen herangezogen. Aus diesen Ergebnissen wurde die Hypothese des endosymbiontischen Ursprungs der Mitochondrien und Chloroplasten abgeleitet. Der Nachteil aller bisher genannten Beispiele ist der, daß diese Pro-

telne, sowie auch die 5S rRNA, nicht in allen Organismen vorkommen, d.h. Vergleiche nur zwischen den Organismusgruppen möglich sind, welche die Jeweilige Komponente enthalten. Man zeigte folglich sehr bald großes Interesse an der Untersuchung der kleinen rRNAs (S rRNAs) verschiedener Species, da dieses Molekül (neben tRNAs und L rRNA) ubiquitär ist. Gegenüber den extrem kurzen tRNAs besitzt sie den Vorteil größerer statistischer Signifikanz und gegenüber der L rRNA den Vorteil der geringeren Länge (Gray et al., 1984). Extensiv wurde dieses Molekül in *E. coli* von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht, und Sekundärstrukturmodelle wurden aufgestellt (Noller und Woese, 1981; Glotz und Brimacombe, 1980; Stiegler et al., 1981; Woese et al., 1983; Gray et al., 1984). Nach und nach wurden Sequenzdaten auch von S rRNAs anderer Organismen und Organellen verfügbar und ihre Sekundärstruktur mit dem *E. coli* Modell verglichen. In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, daß bei der Aufstellung dieser Sekundärstrukturmodelle vergleichend vorgegangen werden muß. Man darf nicht generell den vom thermodynamischen Standpunkt optimal stabilen Strukturen den Vorzug geben, sondern die Strukturen als relevant werten, die sich im Vergleich mit anderen Organismen bestätigen. Durch solche Vergleiche offenbarte sich ganz eindeutig der konservative Charakter dieses Moleküls, d.h. die Sekundärstruktur von S rRNAs wurde in der Evolution stark konserviert. Es war möglich durch Vergleich zahlreicher S rRNA-Sequenzen universelle Strukturen zu identifizieren.

ren und ein "Allgemeines Modell" aufzustellen (Stiegler et al., 1981; Gray et al., 1984).

Ein Vergleich der Sekundärstrukturmodelle verschiedener S rRNAs machte deutlich, daß alle mitochondrialen S rRNAs stärker der E. coli S rRNA ähneln als cytoplasmatischen S rRNAs. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme eines eubakteriellen Ursprungs der Mitochondrien (Gray, 1983). Ein anderer wichtiger Grund, der das Interesse an diesem S rRNA Molekül rechtfertigte, war die Hoffnung allgemeine Einblicke in die Organisation, die Funktion von Ribosomen - und dann detaillierter - in den noch immer ungeklärten, präzisen Mechanismus der Translation zu bekommen (Woese et al., 1983; Carbon et al., 1979).

In diesem Teil der Arbeit werden die Untersuchungen zum Gen der S rRNA des S. pombe Stammes ade7-50h⁻ (50) dargestellt und auf ihren Aussagegehalt hin geprüft. Dieses Gen könnte einen wichtigen Beitrag, sowohl für das funktionale, als auch für das evolutionäre Verständnis beisteuern, da es eine der kürzesten Formen (1422 bp) dieses Moleküls darstellt und damit Minimalanforderungen aufzeigt. Ein Vergleich mit dem "Allgemeinen Modell" bestätigte die meisten der Sekundärstrukturen.

1.2. Erweiterung und Verfeinerung der Restriktionskarte

Es existierten Restriktionsdaten für die mt DNA von *S. pombe* Stamm 50 (Anziano et al., 1983). Um die Karte in der relevanten Region zu überprüfen und zu erweitern, wurden Schnitte mit den Restriktionsenzymen *Ava*I, *Bcl*I, *Hha*I, *Bgl*II, *Ava*II, *Eco*RV, *Hpa*I, *Hind*II, *Hae*III, *Xba*I durchgeführt (vgl. Abb.3) und weiter feinkartiert mit den Restriktionsenzymen *Bst*NI, *Hinf*I, *Taq*I, *Dde*I, *Sau*IIIA, *Alu*I (vgl. Abb.4). Anmerken sollte man in diesem Zusammenhang das Auftreten von Methylierungsphänomenen. Die kartierte Plasmid-DNA wurde nämlich aus einem *dam*⁺ und *dcm*⁺ *E. coli* Stamm isoliert und das hatte eine Methylierung der sich überlappenden Schnittstellen für *Bst*NI und *Ava*II, bzw. *Bgl*II und *Xba*I zur Konsequenz. *Bst*NI (CCmTGG) erwies sich dieser Modifikation gegenüber insensitiv, ebenso *Bgl*II (AGAmTCT), Jedoch *Ava*II (GGACcm) und *Xba*I (TCTAGAm) schneiden an solchen methylierten Schnittstellen nicht.

Abb.3: Die Restriktionskarte des für die Lage des *Sr*rNA-Gens relevanten Bereichs aus Stamm 50 und die Ergebnisse zur relativen Position der zugehörigen Gene. Das Gen der *S r*rNA ist als schwarzer Balken sichtbar, eingebettet zwischen tRNAs, die als schwarze Punkte markiert wurden. Die gestrichelten Sites weisen darauf hin, daß *Ava*II bzw. *Xba*I diese Sites nicht schneiden, da sie methylierte *Bgl*II bzw. *Bst*NI Sites überlappen (nähere Erläuterung hierzu, siehe Text).

Abb.4: Restriktionsfeinkarte der Region des *S r*rNA-Gens und Darstellung der Sequenzstrategie (Pfeile).

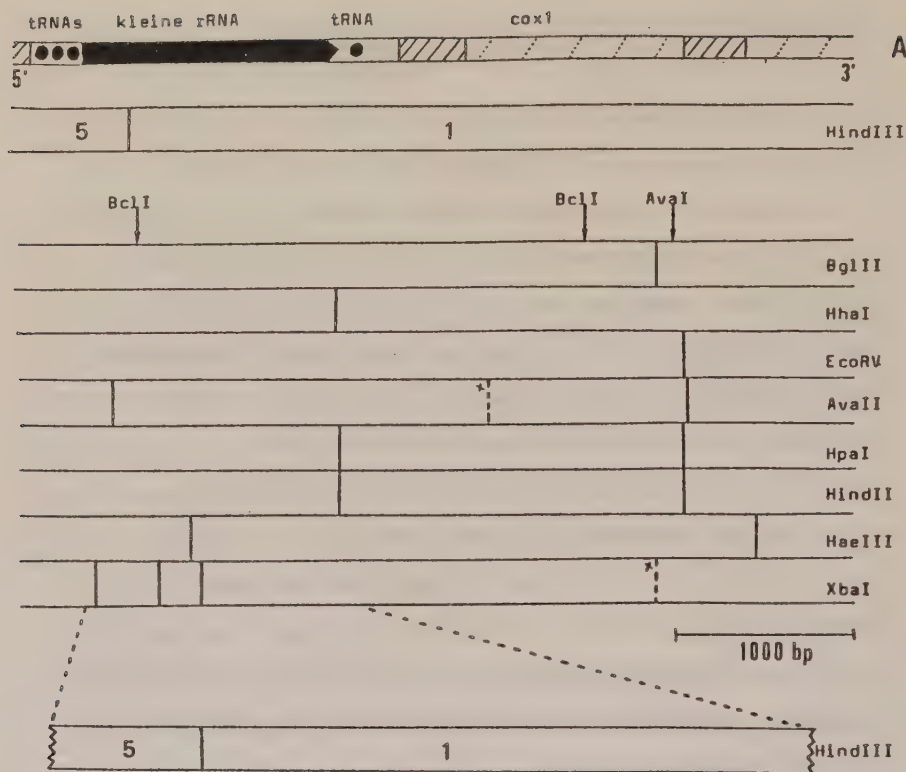


Abb.3

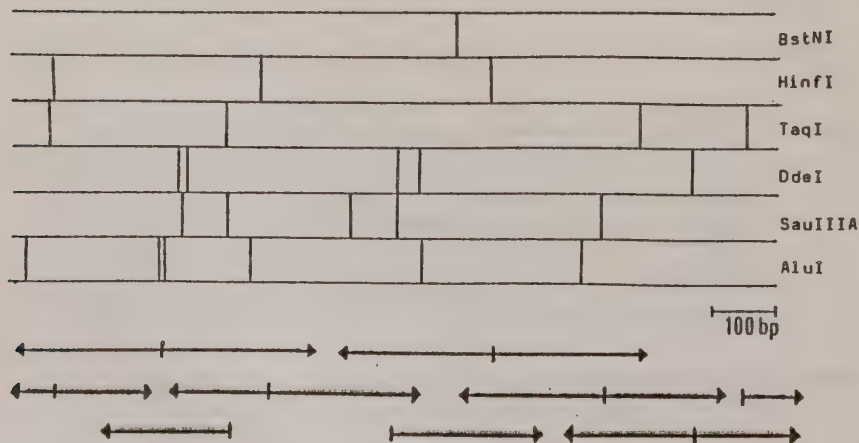


Abb.4

1.3. Feinkartierung des mt Gens der S rRNA durch Hybridisierungsdaten

Die grobe Position der Gene für die L rRNA und die S rRNA waren durch Hybridisierungsexperimente von Anziano et al. (1983) bekannt. Für die Klonierungsstrategie und die DNA-Sequenz-Analyse war es nötig die Position präziser zu bestimmen. Dies wurde durch Hybridisierung von DNA-Fragmenten erreicht, die auf Nitrozellulose transferiert wurden, mit ^{32}P -ATP markierter S rRNA-Probe (vgl. Abb.5). Das Ergebnis sieht man in Abb.6. Daraus wird klar ersichtlich, daß die Region zwischen der XbaI-5/7-site und der HpaI-2/3-site für die Untersuchung relevant ist.

Nachdem man jetzt auch die Sequenzen der flankierenden Regionen und vor allem die des L rRNA-Gens kennt (Lang, unveröff. Daten), stellt sich die Situation der Lage des S rRNA-Gens wie folgt dar (Abb.7; vgl. auch Abb.1 Gesamtüberblick):

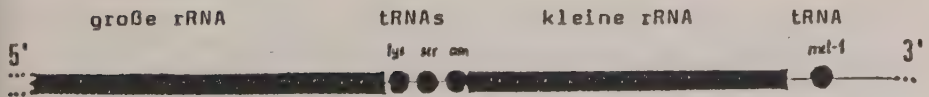


Abb.7: Skizze zur Lage des Gens der S rRNA und seiner unmittelbaren Umgebung.

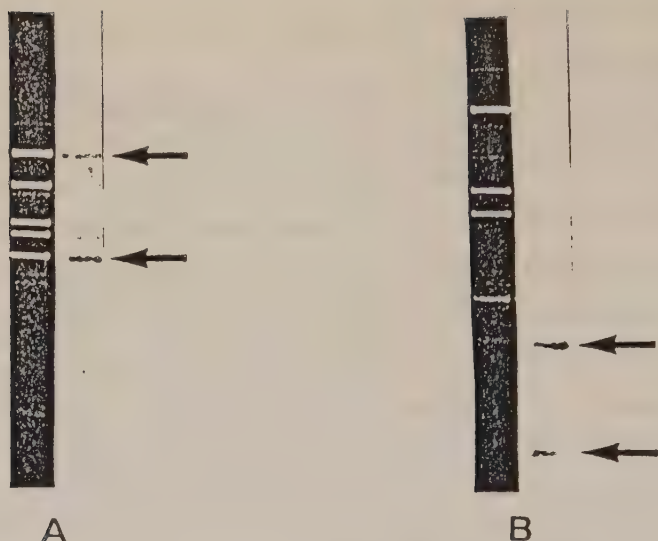


Abb. 5: Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten S rRNA Probe. Die linke Spur zeigt jeweils die EB angefärbten DNA-Restriktionsfragmente (dunkler Hintergrund), die zugehörige Hybridisierung mit der radioaktiv markierten S rRNA sieht man in der rechten Spur (heller Hintergrund). Die Spuren "A" stellen einen *AvaII*-Verdau des größten *EcoRI*-Fragments dar. Signale sind zu erkennen mit Fragment *AvaII*-5 und *AvaII*-(3+6) (vgl. auch Abb. 6). Die Spuren "B" sind ein *XbaI/HpaI*-Doppelverdau des *EcoRI*-1-Fragments. Signale sind zu erkennen mit Fragment *XbaI*-7 und einem Subfragment von *XbaI*-(3+2) (vgl. auch Abb. 6).

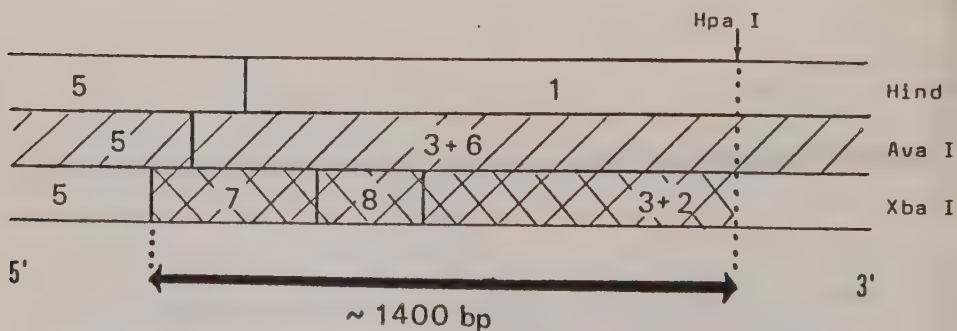


Abb. 6: Ergebnisse der Hybridisierung mit radioaktiv markierter S rRNA. Schraffliert sind die Fragmente angegeben, die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten S rRNA ergaben (vgl. auch Abb. 5). Der für die Lage des Gens der S rRNA in Frage kommende Bereich hat eine Länge von circa 1400 bp (schwarzer Pfeil).

Es sollten drei typische Merkmale erwähnt werden. Erstens liegt das Gen für die S rRNA sehr nahe am Gen für die L rRNA. Es liegen nur 300 bp dazwischen, während der Abstand zwischen diesen zwei Genen 30000 bp bei *S. cerevisiae* beträgt, also 100x soviel (Sriprakash et al., 1980), oder etwa 3000 bp bei *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*), also 10x soviel (Köchel und Küntzel, 1981). *Neurospora crassa* (*N. crassa*) weist einen Abstand von 5000 bp (Heckman und RajBhandary, 1979), *Torulopsis glabrata* von 2500 bp (Clark-Walker et al., 1980) und *Kluyveromyces lactis* von 2250 bp (Groot und Van Harten-Loosbroek, 1980) auf. Das bedeutet, daß unter den bisher untersuchten Ascomyceten *S. pombe* mit seinem geringen Abstand von 300 bp einzig dasteht.

Im Vergleich mit dem mt Genom der Säuger sind auch hier die beiden Gene in unmittelbarer Nachbarschaft. Sie werden auf dem Säuger-mt Genom durch ein einziges tRNA-Gen getrennt, in *S. pombe* durch drei tRNAs.

Zweitens ist die Orientierung dieser beiden Gene zueinander höchst ungewöhnlich. Das Gen der S rRNA liegt downstream vom Gen der L rRNA. Gewöhnlich ist die Situation revers, d.h. in Organismen wie *A. nidulans* (Köchel und Küntzel, 1981), Mensch (Anderson et al., 1981), Maus (Bibb et al., 1981), *Kluyveromyces lactis* (Groot und Van Harten-Loosbroek, 1980), *T. glabrata* (Clark-Walker et al., 1980), *N. crassa* (Heckman und RajBhandary, 1979) liegt das Gen in Transkriptionsrichtung 5' vom L rRNA-Gen.

Im Pilz-System ist bisher kein anderer Fall für eine reverse Orientierung der rRNA-Gene bekannt.

Drittens ist das Gen flankiert von tRNAs: Am 3' Ende liegt die tRNA^{met-1} etwa 35 bp downstream, am 5' Ende die tRNA^{asn}

Im direkten Anschluß ohne eine Base dazwischen. Das bedeutet, daß keine promotorähnlichen Sequenzen, wie sie in *S. cerevisiae* gefunden wurden (Osinga und Tabak, 1982; Christianson et al., 1982), vorhanden sein können. Möglicherweise existiert eine Art von Processierung, ähnlich der "tRNA-Punktuation" in Säugermitchondrien (Borst und Grievell, 1981), denn die Flankierung durch tRNAs kann auch an anderen Genen von *S. pombe* beobachtet werden (Lang et al., 1983).

Zuletzt sollte noch erwähnt werden, daß die zwei rRNA-Gene (außer tRNA-Genen) die ersten zwei Gene nach einem eventuell für das ganze Genom verantwortlichen Promotor sind und eine Möglichkeit für die Regulierung der Transkriptmengen ein vorzeitiges Abbrechen der Transkription wäre. Das würde auch die Beobachtung erklären, daß die rRNAs, die am stärksten repräsentierten RNA-species im mt Genom von *S. pombe* sind (Anziano et al., 1983). Eine andere Möglichkeit wäre ein Mechanismus, ähnlich dem von Montoya et al. (1983) für das mt Genom des Menschen beschriebenen. Hier liegen zwei Transkriptions-Initiationsstellen auf dem "H-Strang" vor, in der Region kurz vor den rRNA Genen. Initiation an der ersten Stelle endet nach Transkription der beiden rRNA Gene (am 3'Ende des S rRNA Gens). Initiation an der zweiten Stelle führt zu einer Transkription über die beiden rRNA Gene hinaus, so daß eine polycistronische RNA gebildet wird, die fast dem ganzen H-Strang entspricht. Eine unterschiedliche Effizienz der beiden Initiationssites könnte die hohe rRNA Syntheserate erklären.

1.4. Klonierung und DNA-Sequenz des mt Gens der S rRNA und Bestimmung des 5'- und 3'Endes durch S1-Nuclease-Kartierung

Die durch Hybridisierungs-Feinkartierung begrenzte relevante Region wurde in den Vektor pBR322 einkloniert. Die resultierenden Klone pFM 111-2 und pFM 25 (vgl. Material und Methoden) wurden nach 5'- oder 3'Markierung und Strangtrennung spezifischer DNA-Restriktionsfragmente sequenziert. Die abgeleitete Sequenz ist in Abb.8 aufgezeigt. Die totale Länge des Gens beträgt 1422 bp. Diese Länge ist ähnlich der von *A. nidulans*: 1443 bp (Köchel und Küntzel, 1981). Verglichen mit den Längen der S rRNA-Gene anderer Ascomyceten repräsentiert es eine der kürzesten Formen und reflektiert damit Regionen, die für die Funktion wichtig sind. So hat das Gen von *N. crassa* eine Länge von etwa 1700 bp (Heckman und RajBhandary, 1979), von *S. cerevisiae* 1460 bp (Sor und Fukuhara, 1982). Der GC-Gehalt im S rRNA-Gen von *S. pombe* beträgt 34%. In *S. cerevisiae* ist der GC-Gehalt 22%, in *E. coli* 54% (Sor und Fukuhara, 1982a; Carbon et al., 1978). Für Introns liegen keine Hinweise vor, ebensowenig für die GC-reiche Insertion in der Mitte des Gens von *S. cerevisiae* (Sor und Fukuhara, 1982b). Die S1-Nuclease-Experimente weisen auf ein präzises 5'Ende hin. Das 3'Ende scheint unpräzise zu sein (5-8 Signale). Wie schon erwähnt, folgt direkt am 5'Ende des Gens eine tRNA. Daher existiert keine Möglichkeit für eine Promotorregion oder einen Leader. Die 17 homologen Nucleotide, die Osinga und Tabak (1982) in der Initiations-

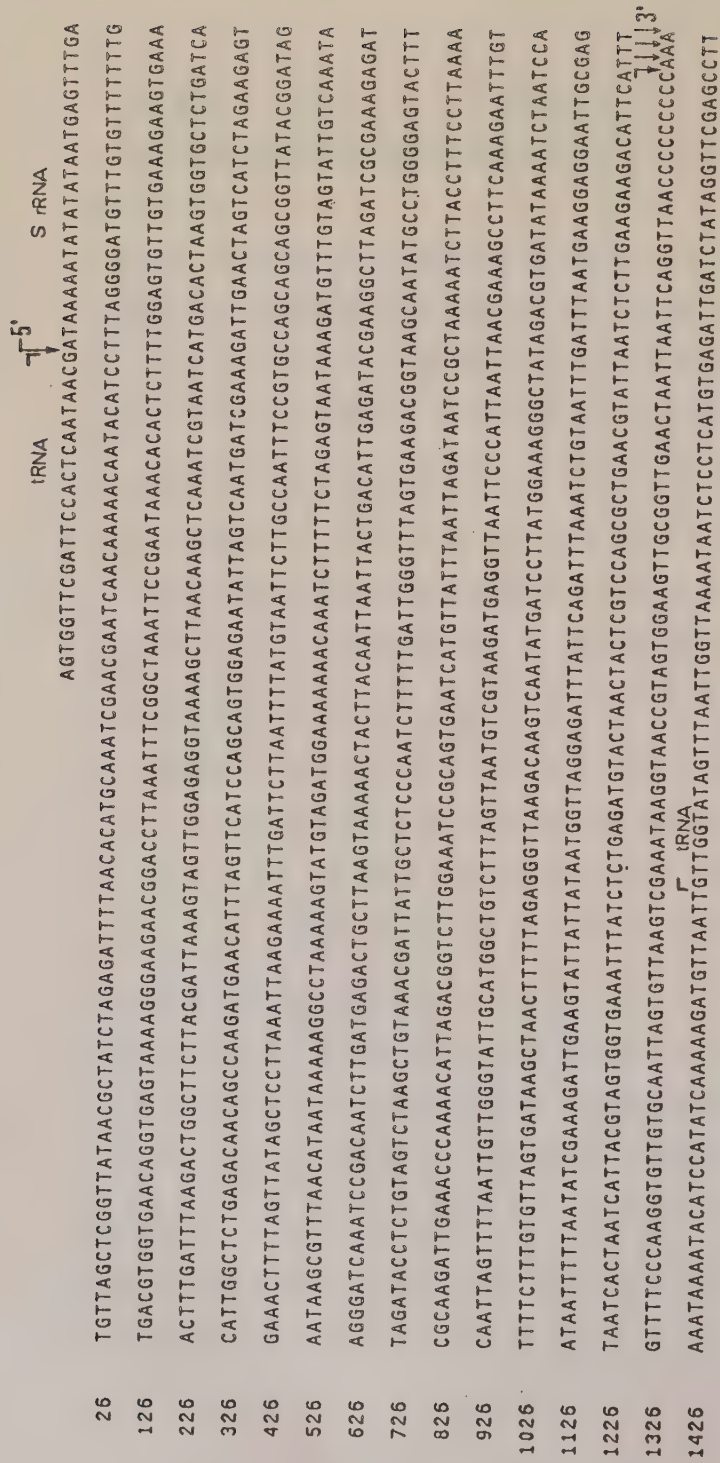


Abb.8: Komplette Nucleotidsequenz des mitochondrialen Gens der S rRNA von S. pombe Stamm 50 und angrenzender Bereiche in 5'-3'Richtung. Aus den Si-Nuclease Experimenten ergab sich ein Signal am 5'Ende, das mit einem einzelnen Pfeil markiert ist und mehrere Signale am 3'Ende, die mit mehreren Pfeilen markiert sind.

sequenz des 5 rRNA- und 1 rRNA-Gens von *S. cerevisiae* entdeckt haben, lassen sich in *S. pombe* nicht finden.

Der Processierungsweg von *S. cerevisiae* (Christianson et al., 1982), daß die circa 80 Nucleotide des Prekursortranskripts upstream vom 5'Ende der reifen 5 rRNA unpräzise processiert werden, kann für *S. pombe* nicht gelten. Am 3'Ende des Gens in *S. pombe* fällt ein Poly C-Cluster (neun Cytosinnucleotide) auf. Alle anderen mt Gene (also auch proteincodierende Gene) von *S. pombe* zeigen an ihren 3'Enden ebenfalls einen C/U-reichen Cluster (Lang et al., 1983). Vermutlich handelt es sich bei diesen Clustern um Processierungssignale für die Bildung der 3'Enden reifer mRNAs. Auch Osinga et al. (1984) finden an den 3'Enden der mt Gene von *S. cerevisiae* eine konservierte Sequenz aus 12 Nucleotiden, die in der Evolution gut konserviert zu sein scheint, denn sie tritt in unveränderter Form auch am 3'Ende des r1 URF von *Kluyveromyces thermotolerans* auf (Jacquier und Dujon, 1983). Osinga et al. (1984) stellten die Hypothese auf, daß diese Sequenzen bei der Bildung der 3'Enden von reifen mRNAs aus Prekursortranskripten eine Rolle spielen. Diese "Dodekamer-Sequenzen" lassen z.T. Ähnlichkeiten mit den weniger einheitlichen C/U-reichen Clustern von *S. pombe* erkennen. Eine Bestätigung der Hypothese durch RNA-Sequenz-Analyse steht in allen drei Fällen noch aus.

Das S1-Nuclease-Experiment zeigt 5-8 Signale am 3'Ende, während Christianson et al. (1982) das 3'Ende als exakt beschreibt und für diese Exaktheit eine funktionelle Bedeutung postuliert. Weiterhin ließ sich eine Shine-Dalgarno-ähnliche

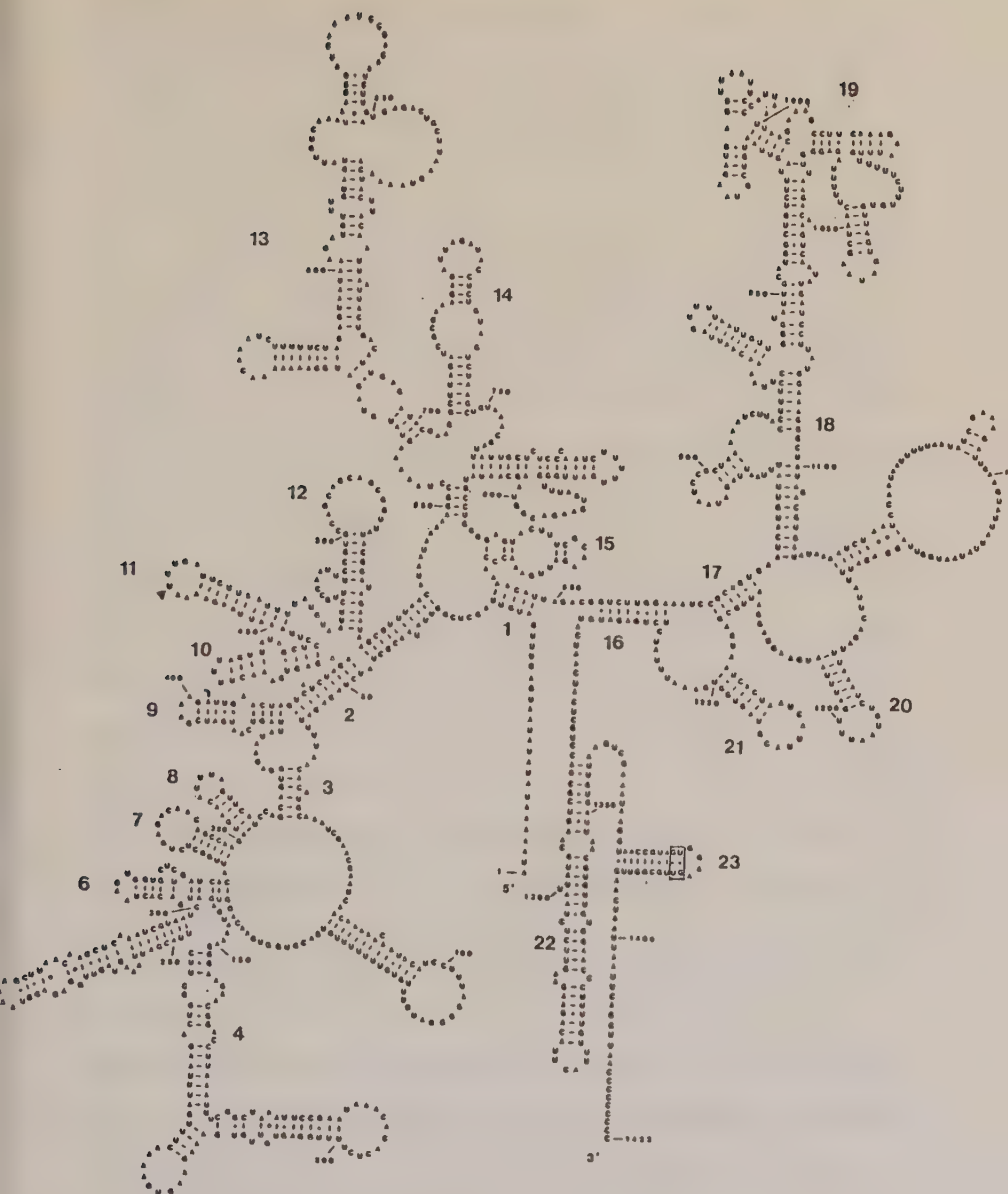
Sequenz in *S. pombe* nicht finden, wie sie für *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Christianson et al., 1982).

Da viele Regionen der *S. pombe* rRNA-Sequenzen von *S. pombe* signifikante Homologie mit der *E. coli* 16S rRNA-Sequenz zeigen, wurde ein Alignment durchgeführt, wobei versucht wurde maximale Homologie mit minimaler Zahl von Deletionen bzw. Insertionen zu erreichen. Etwa 42% Homologie konnte zwischen diesen beiden *S. pombe* rRNA-Genen festgestellt werden (Trinkl et al., in Vorb.). Die Homologie mit der *E. coli*-Sequenz beträgt für *A. nidulans* 59% (Köchel und Küntzel, 1981), für *S. cerevisiae* 44% (Sor und Fukuhara, 1982).

1.5. Komplette Sekundärstruktur und Vergleich ausgewählter Strukturen mit anderen Species

Kürzlich veröffentlichten Gray et al. (1984) ein "Allgemeines Modell" der Sekundärstruktur von *S. pombe* rRNA-Genen, basierend auf dem eubakteriellen 16S rRNA Strukturmodell von *E. coli*, das Woese et al. (1983) aufstellten. Es war von Interesse, ob auch die *S. pombe* rRNA von *S. pombe* in dieses Schema passen würde, beziehungsweise ob hier Ausnahmen existierten. So wurde die komplette Sekundärstruktur nach dem Modell von Gray et al. (1984) aufgestellt (vgl. Abb.9). Es war augenfällig, daß das

Abb.9: Sekundärstrukturmodell der *S. pombe* rRNA von *S. pombe* Stamm 50, in Anlehnung an das Modell für *E. coli* (Woese et al., 1983). Die zwei gerahmten Paarungen im letzten Stem vor dem 3'Ende zeigen die, von van Knippenberg et al. (1984) für eine Klassifizierung benutzten, an. Mit einem * ist die Base markiert, für die im *S. pombe* Stamm EF1 ein Austausch (C statt T) gefunden wurde.



Modell der S rRNA von *S. pombe* nahezu perfekt dem "Allgemeinen Schema" von Gray et al. (1984) gleich. Um zu prüfen, ob sich dieser erste Eindruck auch bei detaillierter Betrachtung bestätigen läßt, wurden einzelne charakteristische Regionen untersucht. Vom 5'Ende beginnend findet man die Struktur 1 (vgl. im folgenden mit Abb.9). Diese Paarung wurde in dieser Form durch das "Allgemeine Modell" bestätigt und zählt zu den hoch konservierten Strukturen. Als Besonderheit sei hier aufgezeigt, daß sowohl im Falle von *S. pombe*, als auch im Falle von *A. nidulans* eine Ausweitung der Struktur auf 10 Paarungen möglich ist. Zur Veranschaulichung werden im folgenden beispielhaft die Sequenzen der Struktur 1 einiger Species aufgeführt, wobei die Paarungen mit durchgezogenen Strichen, die zusätzlich möglichen Paarungen mit unterbrochenen Strichen gekennzeichnet sind. Die Referenzen zu den Sequenzen der Species finden sich bei Woese et al. (1983).

<i>S. pombe</i> :	GAGUUUGAUGUAGCUC....CCCAA <u>ACAUAGAC</u> GG
<i>A. nidulans</i> :	GAGUUUGAUGAUGGCUC....CUGAA <u>AUCAUAGAC</u> GG
<i>E. coli</i> :	GAGUUUGA <u>UCAUG</u> GCUC....CUCAA <u>UGAAU</u> GACGG
<i>S. cerevisiae</i> :	GAAUAUGA <u>UGUUG</u> GUUC....CUCAA <u>ACAAU</u> GACGG

Struktur 2 und 3 zählen ebenfalls zu den hoch konservierten Strukturen und werden als solche durch die S rRNA von *S. pombe* bestätigt.

Die Strukturen 4-8 gelten als "halb konservierte" Strukturen, da leichte Modifikationen, besonders bei mitochondrialen S rRNAs von Pilzen und Protisten, auftreten. *S. pombe*

rechtfertigt auch diese Aussage, da leichte Modifikationen zu beobachten sind.

Eine weitere hoch konservierte Struktur ist die Helix 9. In dieser Region entspricht die S rRNA von *S. pombe* völlig dem "Allgemeinen Modell".

Die halb konservierte Struktur 10 weist in *S. pombe* stärkere Modifikationen auf, so ist der ausgeloopte Bereich wesentlich kürzer. Jedoch berichten auch Woese et al. (1983) über schwache Evidenzen für einen phylogenetischen Beweis dieser Struktur.

Wenig starke Konservierung findet man auch in Struktur 11. Diese ist in *S. pombe* stark verkürzt und weist einen hohen A+U-Gehalt auf, was in dieser Region für Pilzmitochondrien typisch zu sein scheint (Woese et al., 1983).

Die hoch konservierte Helix 12 zeigt offenbar in allen mitochondrialen Vertretern Abweichungen bezüglich der Zahl der ausgeloopten Basen. In *S. pombe* sind dies 8 Basen. Die übrige Struktur ist perfekt erhalten.

Struktur 13 besteht aus einer Helix mit stark variablem Charakter, die in *S. pombe* drastisch verkürzt auftritt und einer halb konservierten Helix, die in *S. pombe* mit leichten Modifikationen vorkommt. Damit steht auch diese Struktur in keinem Widerspruch zum "Allgemeinen Modell".

Struktur 14 ist sowohl bezüglich der Sekundärstruktur, als auch bezüglich bestimmter Primärstrukturen hoch konservativ und mag daher eine, für die Funktion wichtige Struktur darstellen (Woese et al., 1983). *S. pombe* bestätigt die Struktur des "Allgemeinen Modells" und die Tatsache der Konservierung auf Sequenzniveau.

Eine der wenigen Ausnahmen, in denen *S. pombe* nicht vollständig mit dem "Allgemeinen Modell" übereinstimmt, ist die hoch konservierte Struktur 15. Diese weist in *S. pombe* beträchtliche Abweichungen hinsichtlich der Paarungsmöglichkeiten auf. Vom rein thermodynamischen Standpunkt aus gesehen, ist in *S. pombe* diese Struktur wesentlich schwächer. Zur Veranschaulichung werden beispielhaft die Sequenzen dieser Struktur für einige Species angeführt. Die Kennzeichnung der gepaarten Bereiche erfolgt analog zur Darstellung der Struktur 1.

<i>S. pombe</i> :	GGGAGUACUUUCGCAAGAUUGAAACCCAAAAC
<i>E. coli</i> :	GGGAGUACGGCCGCAAGGUUAAAACUCAAAUG
<i>S. cerevisiae</i> :	AAGAGUAGGUUAGCAAUAAUGAAACUCAAAAC
<i>A. nidulans</i> :	AAGAGUAAUAUGGCAACAUAUAAACUGAAAUC

Struktur 16 ist eine zentrale Struktur von hohem Konservierungsgrad und wurde in allen bisher bekannten Beispielen von S rRNAs gefunden, so auch in *S. pombe*. Zwischen den drei Reichen von Lebewesen, den Eubakterien, den Archaeobakterien und Eukaryoten sind jedoch trotz identischer Sekundärstruktur die Sequenzen völlig verschieden.

In den hoch konservierten Strukturen 17, 18, 20, 21 stimmt *S. pombe* mit dem "Allgemeinen Modell" überein.

Die Struktur 19 findet man in *S. pombe* gemäß ihres halb konservierten Charakters mit leichten Abweichungen vor.

Struktur 22 beinhaltet Regionen starker und mittlerer Konservierung, sowie auch stark variable Abschnitte. Eine

Begrenzung dieser Struktur durch G-A, wie sie Woese et al. (1983) postulieren, findet man nicht. Wie für die meisten Pilz- und Protistenmitochondrien gezeigt, sind die flankierenden Sequenzen gut konserviert, jedoch nicht so stark wie in anderen Organismen.

In Struktur 23 seien einige interessante Aspekte aus der Arbeit von van Knippenberg et al. (1984) angeführt.

Van Knippenberg et al. (1984) berichteten in ihrer Veröffentlichung über die Phylogenie der konservierten Struktur am 3'Ende der S rRNAs, der am stärksten konservierten Region dieses Moleküls. Sie verglichen 29 Organismen und versuchten Hinweise auf einen möglichen Stammbaum abzuleiten bzw. den endosymbiontischen Ursprung dieses eukaryotischen Organells zu beweisen. Vier Hauptstrukturen unterschied man in dieser Region, wobei die Hauptstruktur II der letzte Hairpin vor dem 3'Ende im "Allgemeinen Modell" ist. In diesem Hairpin fand man zwei Paarungen (vgl. Abb.9, gerahmt), die geeignet schienen, die 40 untersuchten Species in zwei Typen zu klassifizieren: Typ 1 und Typ 2. Im Typ 1 sind diese zwei Paarungen G-C(U) und G-C. Zu diesem Typ gehören Mitochondrien der Pflanzen, von *S. cerevisiae*, eukaryotische cytoplasmatische und bakterielle Species. Typ 2 zeigt die Paarungen Py-Pu und (U)C-G und enthält andere Bakterien, Cyanobakterien, Pflanzenchloroplasten und Säuger-mitochondriale RNA. Sie entdeckten zwei RNA-Species, die weder zu dem einen, noch zu dem anderen Typ gehörten. Das sind *A. nidulans* (U-A und A-U) und *Mycoplasma capricolum* (G-C und C-G). Bemerkenswerterweise läßt sich auch die S rRNA von

S. pombe keinem dieser Typen zuordnen (U-G und G-U, vgl. Abb.9, gerahmt) und stellt somit das dritte Mitglied des Typs "X" dar. Die zwei Paarungen im Anschluß an diese eben besprochenen sind in *S. pombe*, sowie auch in allen anderen 40 untersuchten Fällen, A-U und U-G, mit der einzigen Ausnahme von *N. crassa*.

Weiterhin ist eine Klassifikation mittels der Sequenz im Loop dieses Hairpins möglich: Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten enthalten GGAA, eukaryotische cytoplasmatische S rRNA enthält UGAA.

Abschließend läßt sich feststellen, daß das "Allgemeine Modell" auch durch die sehr kleine S rRNA von *S. pombe* Stamm 50 Bestätigung findet. Es handelt sich hierbei offensichtlich um eine hoch konservierte Struktur. Es ist anzunehmen, daß die von diesem kurzen Gen gebildeten Strukturen für die Funktion des Moleküls von Wichtigkeit sind. Diese Bereiche fallen zudem zusammen mit den im "Allgemeinen Modell" postulierten Bereichen, was deren Signifikanz unterstreicht. Die Frage stellt sich nun, ob diese starke Konservierung auch beibehalten wird zwischen *S. pombe* Stämmen, die sich in der Länge ihrer mitochondrialen Genome stark unterscheiden. Ein mit dem hier untersuchten *S. pombe* Stamm 50 nahe verwandter Stamm EF1 (CBS 356) wies eine Verkürzung des mt Genoms um etwa 10% auf. Ein 300 bp langes HindIII-HaeIII Restriktionsfragment aus dem Genbereich der S rRNA dieses Stammes EF1 wurde sequenziert. Es wurde nur 1 Austausch (zudem in einer nicht so stark konservierten Region) gefunden (vgl. Abb.9, mit O markiert).

2. Kontinuierliches Gen für Apocytochrom b (cob) im *S. pombe* Stamm EF1 (CBS 356) und Sequenzvariationen in der Region der Introninsertion im Stamm 50

2.1. Kurze Einführung

Wie im vorangegangenen Teil und auch in der allgemeinen Einteilung bereits erwähnt, findet man bei verschiedenen Stämmen der Species *S. pombe* Variationen im mitochondrialen Genom. Die Genomlänge beispielsweise reicht von nur 17,6 kbp beim Stamm EF1 bis circa 23 kbp beim Stamm EF2. Verschiedene Erklärungsmöglichkeiten sind hierfür denkbar, wie unterschiedliche Länge intergener Spacerbereiche, Genbereichsduplikationen, Vorhandensein oder Fehlen von URFs (unassigned reading frames), oder Auftreten von Introns in verschiedener Zahl. Der hier untersuchte *S. pombe* Stamm EF1 hat mit 17,6 kbp ein um etwa 2 kbp (also etwa 10%) verkürztes mt Genom, verglichen mit dem *S. pombe* Stamm 50. Es drängte sich die Frage auf, was die Ursache(n) dieser Variation war(en). Zimmer et al. (1984) lieferten durch DNA-Hybridisierungen mit Proben aus dem Stamm 50 Hinweise dafür, daß dem Stamm EF1 das einzige Intron des Apocytochrom b (cob)-Gens fehlt. Zunächst jedoch einige allgemeine Bemerkungen über Introns. Viele eukaryotische Gene, ob nucleär, mitochondrial oder plastidiär sind diskontinuierlich, d.h. die Strukturgenbereiche werden von Introns unterbrochen. Um exprimiert werden zu können, müssen die primären RNA-Transkripte processiert werden, indem die

Intron-RNA entfernt und die Exon-RNA wieder ligiert werden muß.

Hinsichtlich der Terminologie herrscht Uneinigkeit darüber, was genau unter dem Begriff "Splicen" = "Spleißen" zu verstehen ist, ob der Vorgang als Ganzes oder nur das Zusammenfügen der Enden. In dieser Arbeit wird der Vorgang als Ganzes mit "Processieren" benannt und das Zusammenfügen der Enden mit "Spleißen".

Im Gegensatz zu den mt Genomen der Säuger, bei denen offenbar grundsätzlich nie diskontinuierliche Gene vorkommen, enthalten alle mt Genome der bisher untersuchten Pilze ein oder mehrere Gene mit Mosaikstruktur (Dujon, 1983). Es betrifft dies in Pilzen meist die Gene für *cob*, die *L rRNA* und *cox1*.

Manche Introns besitzen offene Leserahmen (ORF), meist in Phase mit dem vorausgehenden Exonleserahmen. In *S. cerevisiae* konnte man den Nachweis erbringen, daß einige dieser Introns für sog. "Maturasen" codieren, denen eine Rolle im Processieren der Intron-RNA aus dem Primärtranskript zugesprochen wird (Jacq et al., 1984; Guiso et al., 1984). In *N. crassa* postuliert man für den ORF im Intron der *L rRNA*, daß er für ein ribosomales Protein codieren könnte (Burke und RajBhandary, 1982). Diese Hinweise auf codierende Funktionen der mt Introns sind interessant, da für Introns chromosomaler Gene bisher keine Genprodukte bekannt sind (Grivell, 1983).

Die Introns der mt Gene von Pilzen, Chloroplasten, Pflanzen und von Kern rRNA-Genen aus Protozoen unterscheiden sich in einigen Merkmalen, sowohl von denen der Kerncodierten Proteingene, als auch von Introns in tRNA-Genen. Man findet keine Konsensussequenzen an den Exon-Intron Grenzen, wie sie typisch sind für kerncodierte Proteingene. Dafür kommen kurze invariante Sequenzbereiche in diesen Introns vor, und sie lassen sich zudem in eine charakteristische Sekundärstruktur falten (Waring und Davies, 1984). Eine Einteilung dieser Introns in zwei Hauptgruppen (Gruppe I/II) nahmen Michel und Dujon (1983) auf Grund spezifischer Merkmale vor. Diese Merkmale sind teils invariante Nucleotidsequenzen, teils konservierte Sekundärstrukturen, die zur Ausbildung einer sogenannten "Core-Struktur" beitragen. Das bedeutet, daß man Introns einer Gruppe nach einem bestimmten Muster falten kann und außerdem charakteristische Sequenzregionen invariant in diesen Introns vorzufinden sind. Weiter liegt in den meisten Fällen ein ORF in den Introns vor, der in der Regel ebenfalls zwei kurze Regionen mit konservierter Aminosäurezusammensetzung (den sog. LAGLI-DADG-Regionen) am 3'Ende aufweist. Für das Processieren der Introns scheint also offensichtlich eine bestimmte interne Sekundärstruktur wichtig zu sein, im Gegensatz zu konservierten Exon-Intron Grenzen bei den kerncodierten Proteingenen.

Überraschenderweise fand man, daß in verschiedenen Laborstämmen einer Species homologe Gene eine unterschiedliche Anzahl an Introns enthalten (sog. "optionale Introns"). Das

cob-Gen hat in einigen *S. cerevisiae* Stämmen beispielsweise 5 Introns, den "long" Formen, während der "short" Form in *S. carlsbergensis* die ersten drei Introns fehlen, das Gen also nur 2 Introns aufweist (Lazowska et al., 1980; Nobrega und Tzagoloff, 1980). In *A. nidulans* wurde ein Intron im cob-Gen gefunden, während dieses Intron in *A. nidulans quadri-lineatus* nicht nachgewiesen werden konnte (Waring et al., 1984; Earl et al., 1981; Turner et al., 1982). Außerdem konnte man durch Genkonstruktion (Perlman et al., 1980; Labouesse und Slonimski, 1983) und Intron-DNA-Excision (Gargouri et al., 1983) zeigen, daß in *S. cerevisiae* alle Introns des cob-Genes für die Synthese des Apocytochrom b verzichtbar sind.

Das cob-Gen des *S. pombe* Stammes 50 besitzt ein einziges Intron der Gruppe II (Lang et al., 1985; Lang et al., 1983). Hinweise lagen vor, daß dieses Intron dem Stamm EFl fehlt (Zimmer et al., 1984). In diesem Teil des Kapitel III werden die Untersuchungen für detaillierte Angaben zu diesem Sachverhalt beschrieben.

2.2. Verfeinerung der Restriktionskarte und Klonierung des relevanten Bereichs für das cob-Gen von Stamm EFl

Mit spezifischen cob-Proben haben Lang und Wolf (1984) gezeigt, daß das cob-Gen im *S. pombe* Stamm 50 Mosaikstruktur aufweist. Die DNA-Sequenzierung (Lang et al., 1985) ergab, daß das cob-Gen von einem Intron der Gruppe II (Bezeichnung gemäß Michel und Dujon, 1983) unterbrochen wird. Dieses be-

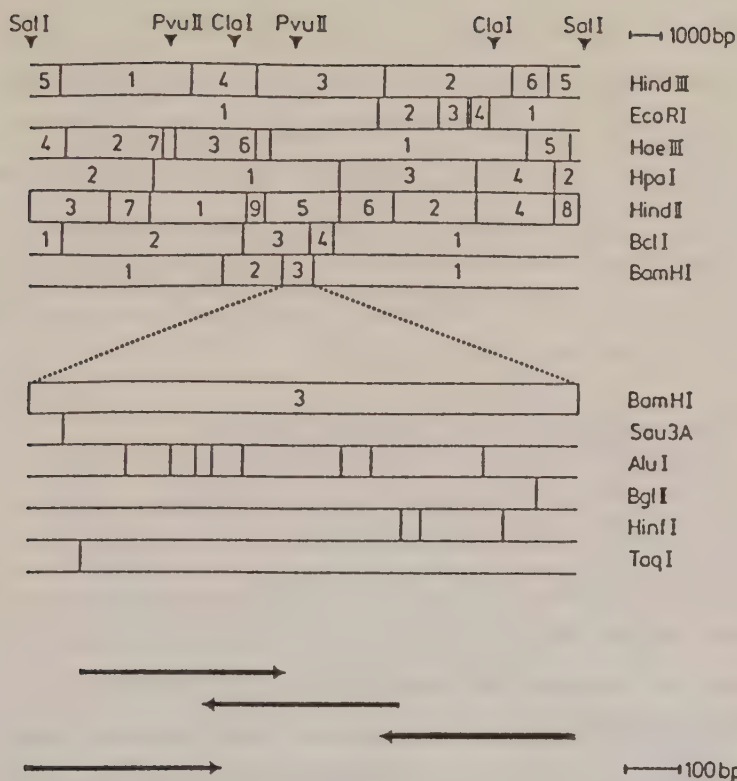


Abb.10: Restriktionskarte des mitochondrialen Genoms von *S. pombe* Stamm EF1 (Daten von Zimmer et al., 1984).

Abb.11: Restriktionsfeinkarte des dritten BamHI-Fragments und Sequenzstrategie (Pfeile). Daten aus Trinkl et al. (1985).

sitzt einen offenen Leserahmen, der in Phase mit dem vorausgehenden Exon ist. Zimmer et al.(1984) haben das homologe Gen in den Restriktionsfragmenten HindIII-3, HindII-5 und BamHI-3 (vgl. Abb.10) des mt Genoms von Stamm EF1 lokalisiert. Die fehlende Hybridisierung einer cob-Intron-Probe des Stammes 50 mit mt DNA von Stamm EF1 wies auf die Abwesenheit eines Introns (zumindest in der Größe) hin. Um die Struktur des cob-Gens in diesem Stamm zu bestimmen, wurde das BamHI-3-Fragment (900 bp) feinkartiert (Abb.10) und in pBR322 kloniert (Klon TPM 2, bzw. der identische Klon TPM 3; vgl. Material und Methoden).

2.3. Nucleotidsequenz des BamHI-3-Fragments

Das in den Klonen TPM 2 (bzw. TPM 3) vorliegende BamHI-3-Fragment wurde mittels der Maxam-und-Gilbert-Methode sequenziert. Die Sequenzstrategie ist in Abb.11 angegeben. Die Sequenz selbst und ihr Alignment mit den entsprechenden Bereichen des cob-Gens des Stammes 50 ist aus der Abb.12 ersichtlich. Die DNA-sequenz dieses BamHI-Fragments enthält 138 bp des cob-Leaders und 773 bp der codierenden Regionen, d.h. die gesamte, dem Exon 1 von Stamm 50 entsprechende Region und 89 bp der Region des Exon 2. Das Alignment der beiden Sequenzen zeigt deutlich, daß das cob-Gen im Stamm EF1 kontinuierlich vorliegt.

TATTATCCAATACCCTTTTAAATAAGATTGGATCTTTTTTCCCAATTCCTTCAAATTTT
T

TGACTATTTATCGAGAATGATTGTTCAATTTAGAAGGGATAATTTCAAATTTAATTTT
T

1 (1) ATG AAA ATT TTA AAA TCT AAT CCT TTT TTA GCT TTG GCT AAT AAT
46 (16) TAT ATG ATT GAT GCT CCT GAA CCT TCA AAT ATT TCA TAC TTC TGG
91 (31) AAT TTT GGT TCT CTT TTA GCT TGT GTA TTA GTT ATT CAA ATT GTA
136 (46) ACT GGT ATA CTT TTA GCT TGT TCT TAT ATT CCT AAT ATG GAT TTA
ATC TTT
181 (61) GCT TTC CTT TCA GIT GAA AGA ATT GTT AGA GAT GTA AAT TAT GGT
226 (76) TTC TTA TTA AGA GCT TTC CAT GCA AAT GGT GCT AGT TTC TTC TTT
271 (91) ATC TTC TTA TAC TTA CAC ATA GGT AGA GGT TTA TAT TAT GGT TCT
316 (106) TAT AAA TAT CCA AGA ACA ATG ACA TTG AAT ATT GGT GTT ATT ATC
361 (121) TTC TTA TTA ACT ATT ATT ACT GCC TTC TTA GGT TAC TGT TTA CCA
TTT
406 (136) GCT AAT CAA ATG TCA TTC TGG GGT GCA ACT GTT ATT ACT AAT TTA
451 (151) TTA TCA GCT GTT CCT TTC ATT GGT GAT GAT TTA GTT CAT CTA TTA
496 (166) TGG GGT GGA TTC AGT GTA TCT AAT CCT ACT TTA AAT AGA TTC TTC
TTT
541 (181) TCA CTT CAT TAT TTA ATG CCT TTT GTT ATT GCT GCT TTA TCA GTA
CAC
586 (196) ATG CAT TTA ATT GCT CTA CAT ACT AAT GGT TCA TCA AAT CCA TTA
631 (211) GGT GTA ACA GCT AAT ATG GAC AGA ATC CCA ATG AGC CCG TAC TAT
AAC TAT
676 (226) TTA ATC AAA GAT CTG ATC ACA ATA TTT ATC TTC TTA ATC GGT ATA
CTG ATA ↑ TTG ATA
721 (241) AAT TAC ATG GCA TTC TAT AAT CCA TAT GGA TTT ATG GAA CCA GAT
TAT
766 (256) TGT GCT TT...11 bp...BamHI-3/1

Abb.12: Sequenzvergleich des BamHI-3-Fragments des S. pombe Stammes EF1, das den Hauptanteil des cob-Gens beinhaltet, mit der homologen Region des Stammes 50. Daten aus Trinkl et al. (1985). Die Triplets in der unteren Zeile sind die, die nicht identisch sind im Stamm 50. Die Nummern entsprechen den Basenpositionen, die Nummern in Klammern den Triplets. Der Pfeil zeigt den Splice-punkt an, an dem im Stamm 50 das Intron inseriert ist. In der eingerahmten Region findet man die Häufung der Basenaustausche. Die Sequenzdaten des Stammes 50 stammen von Lang et al. (1985).

2.4. Hohe Homologie zwischen den cob-Genen der beiden Stämme

In den 138 bp des Leaders findet man nur eine T nach C Transition (im folgenden immer im Vergleich zu Stamm 50) und eine T nach G Transversion. Das ist ungefähr die selbe Austauschrate, wie man sie in den codierenden Bereichen feststellen kann. In den 773 bp der codierenden Bereiche kommen 14 Basenaustausche vor: sieben T nach C Transitionen, drei C nach T Transitionen, eine A nach G Transition, eine G nach A Transition und zwei A nach C Transversion. Die allgemeine Konservierung dieses Segments beträgt 98,2% auf dem Nucleotidniveau. Diese 14 Basenaustausche führen zu 12 veränderten Triplets, wovon 9 jedoch stille Substitutionen sind.

In der Aminosäureposition 46 (Abb.12) wird die hydrophobe Aminosäure Isoleucin (ATC) ersetzt durch das hydrophile Threonin (ACT). Diese Position ist hoch konserviert, da *A. nidulans*, *N. crassa*, *S. cerevisiae* und HeLa Zellen, und ebenso *S. pombe* Stamm EF1 an dieser Stelle ein Threonin aufweisen (Abb.13). Ähnlich wird in Position 53 das hydrophobe Phenylalanin (TTT) durch das hydrophile Serin (TCT) ersetzt. In dieser Position jedoch besitzen alle anderen oben erwähnten Organismen ein Histidin.

Auf dem Proteinniveau sind nur 3 von 257 Positionen unterschiedlich. Das entspricht einer Konservierung von 98,8%.

2.5. Gehäufte Basenaustausche im Bereich des Splicepunkts

In der Region zwischen den Nucleotiden 664-693

(Aminosäurepositionen 222-231; gerahmte Sequenz in Abb.12)

Kommen sieben der 14 Basenaustausche gehäuft vor und führen zu sechs geänderten Tripletts. In dieser Region ist das Intron zwischen Lysin (AAA) und Asparagin (GAT) im Stamm 50 inseriert (Abb.13). Mit der Ausnahme des Austausches von Asparagin (AAC) nach Serin (AGC) in Aminosäureposition 222, sind alle anderen Austausche still. Das Alignment von homologen Regionen zwischen den Aminosäuren 222-231 von verschiedenen Organismen (Abb.13) deutet auf eine gewisse Konservierung der Regionen rund um den Splicepunkt hin.

Schizosaccharomyces pombe 50	AAC CCG TAT TAT CTG ATA AAA GAT TTG ATA asn pro tyr tyr leu ile lys asp leu ile
Schizosaccharomyces pombe EF1	AGC CCG TAC TAT TTA ATC AAA GAT CTG ATC ser pro tyr tyr leu ile lys asp leu ile
Neurospora crassa	GCT CCT TAT TAT TTA TTT AAA GAT TTA ATA ala pro tyr tyr leu phe lys asp leu ile
Aspergillus nidulans	GCT CCT TAT TTT ATA TTT AAA GAT TTA ATA ala pro tyr phe ile phe lys asp leu ile
Saccharomyces cerevisiae	CAT TCA TAC TTT ATT TTT AAA GAT TTA GTA his ser tyr phe ile phe lys asp leu val
Zea mays	TAC CCT TAT TTT TAT GTA AAG GAT CTT GTA tyr pro tyr phe tyr val lys asp leu val
Homo sapiens	CAC CCT TAC TAC ACA ATC AAA GAC GCC CTC his pro tyr tyr thr ile lys asp ala leu

Abb.13: Sequenzvergleich der Region der gehäuften Basenaustausche in den *S. pombe* Stämmen EF1 und 50 (durch Punkte gekennzeichnet) mit homologen Sequenzen anderer Organismen. Daten aus Trinkl et al. (1985). Die Sequenz von Stamm 50 wurde Lang et al. (1985) entnommen, wo auch die Referenzen für die anderen Sequenzen gefunden werden können.

Läßt man die 30 Nucleotide von Position 664-693 des cob-Gens unberücksichtigt, so erhöht sich die Homologie zwischen den Genen der beiden *S. pombe* Stämme von 98,2% auf 99,1%. Eine ähnliche Konservierungsrate wurde auch in anderen Bereichen des Genoms festgestellt (H. Trinkl, unveröff. Daten).

Eine vergleichbare Häufung von Basenaustauschen zwischen Stämmen wurde für die Exons 5a und 5b des *cox1*-Gens von *S. cerevisiae* Stamm KL 14-4A mit dem ungeteilten Exon 5 des Stammes D273-10B gefunden (Hensgens et al., 1983). Elf Unterschiede wurden innerhalb von 84 Nucleotiden festgestellt. In diesem Fall sind auch die meisten der Austausche still (meist Austausche in der 3. Position, einer in der 2. und einer in der 1. Position). Nur ein Aminosäureaustausch kommt in dieser Region vor. Die Häufung von Sequenzunterschieden ist offensichtlich, da in den 2344 bp, die zusätzlich untersucht wurden, nur fünf andere Unterschiede auftraten. In diesen zwei *S. cerevisiae* Stämmen ist die Konservierung der Sequenzen (wie sie aus anderen Genen kalkuliert wurde) ebenfalls sehr hoch, nämlich mindestens 99,7%.

Ein interessantes Merkmal dieser Sequenzvariationen zwischen den zwei *S. cerevisiae* Stämmen ist, daß (mit nur einer Ausnahme) die Austausche im Stamm D237-10B zu Codons führen, die sehr selten, wenn überhaupt, im mt Genom dieses Organismus benutzt werden. Für den Fall von *S. pombe* wurde daher der Codongebrauch für den Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 222-231 analysiert, basierend auf dem Codon-

gebrauch einiger bekannter Gene des Stammes 50 (cox1 Exons: Lang, 1984 und B.F. Lang, unveröff. Daten; ATPase Untereinheit 6: B.F. Lang, unveröff. Daten; cox3: B.F. Lang, unveröff. Daten; cob Exons: Lang et al., 1985).

Die Nucleotidaustausche, die in Abb.14 zusammengefaßt sind, weisen jedoch nicht in eine Richtung, wie es der Fall ist bei *S. cerevisiae*. Der Austausch von AAC (Asparagin in der Position 222 im Stamm 50) nach AGC (Serin im Stamm EF1) ersetzt ein selten benutztes Codon durch ein seltenes anderes. ATA und ATC (Austausche in Position 227 und 231) kommen mit vergleichbaren Häufigkeiten vor. Das Gleiche gilt für Position 230, wo TTG gegen CTG ausgetauscht wurde: beide Leucin Codons sind selten. Nur zwei Austausche kommen vor, bei denen ein häufig benutztes Codon durch ein weniger häufig benutztes oder seltenes ersetzt wird. In Position 224 steht im Stamm 50 das Tyrosin Codon TAT, ein häufig benutztes, während das TAC Codon im Stamm EF1 weniger häufig benutzt wird. Dagegen ist in Position 226 das seltene Leucin Codon CTG im Stamm 50 ausgetauscht gegen das häufig benutzte Leucin Codon TTA im Stamm EF1.

Aminosäure	Position	Stamm 50	Stamm EF1	Gebrauch in be- kannten Genen	
Asn-Ser	222	AAC	AGC	AAT 65	TCT 26
				AAC 7	TCT 0
					TCA 46
					TCG 0
					AGT 28
					AGC 5
Tyr	224	TAT	TAC	TAT 59	
				TAC 12	
Leu	226	CTG	TTA	CTT 26	
				CTC 0	
	230	TTG	CTG	CTA 18	
				CTG 3	
				TTA 162	
				TTG 4	
Ile	227	ATA	ATC	ATT 93	
				ATC 23	
	231			ATA 30	

Abb.14: Stammabhängige Sequenzvariationen zwischen den Stämmen 50 und EF1 in der Region des cob-Gens, wo das Intron des Stammes 50 inseriert ist. Die DNA-Sequenzen, die für den Vergleich benutzt wurden, sind die der cox1-Exons, der cob-Exons, cox3 und der ATPase Untereinheit 6 des Stammes 50 (vgl. Text), Daten aus Trinkl et al. (1985).

Hensgens et al. (1983) diskutieren zwei Erklärungsmöglichkeiten für diese Tendenz von häufiger zu seltener benutzten Codons. Erstens könnte der Mechanismus des Intronverlusts interne Rekombination und Fehlerreparatur mit einschließen. Jedoch läßt sich eine plausible Erklärung für die Mutationen, die über 75 bp vom Spleißpunkt entfernt liegen, nur schwer vorstellen. Zudem werden diese Austausche nur in den Exons 5a und 5b beobachtet. Eine andere, etwas attraktivere Erklärung wäre die, daß das Intron verloren ging und daß die seltenen Codons von einer Genkonversion oder einem Rekombinationsereignis zwischen Stamm D273-10B und der mt DNA eines anderen Organismus stammen. Solche Vorgänge könnten sich vor nicht zu langer Zeit ereignet haben, so daß Rückmutationen zu häufiger benutzten Codons noch nicht stattgefunden haben. Jedoch auch diese Hypothese vermag nicht zu erklären, warum diese Sequenzvariationen nicht auch an anderen Exon-Intron-Grenzen auftreten.

Da im Falle von *S. pombe* der Austausch von häufigen gegen seltene Codons nicht unidirektional ist, wie im *cox1*-Gen von *S. cerevisiae* festgestellt, bleibt die Frage offen, ob der Stamm EF1 nie ein Mosaik-cob-Gen hatte, oder ob er sein ehemaliges Intron verloren hat. Dieses Intron könnte jedoch auch in den Kern gewandert sein, falls es eine für das mt Genom wichtige Funktion zu erfüllen hat. Ein solcher Nachweis wurde jedoch bisher auch von *S. cerevisiae* nicht erbracht.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß natürliche *S. pombe* Stämme mit verschiedener Intronzusammensetzung die Möglichkeit bieten, das Zusammenspiel von Introns zu studieren. Die Palette von Stämmen mit verschiedener Zahl von Introns kann erweitert werden durch die Methode der Intronsubtraktion, wie sie von Gargouri et al. (1983) für *S. cerevisiae* beschrieben wurde. In *S. pombe* konnten Merlos-Lange et al. (Manuskript in Vorb.) zeigen, daß das zweite *cox1* Intron entfernt werden konnte. Kreuzt man diesen Stamm mit EF1, so konnte man einen Stamm mit nur einem Intron erhalten. Letztendlich sollte es möglich sein, einen Stamm ohne Introns zu konstruieren. Mit einer geschätzten Länge von etwa 14 kbp wäre dieses Genom sogar kürzer als das der Säugermitchondrien. Die schrittweise Reduktion von Introns könnte Stämme liefern, die z.B. nur noch Introns einer Gruppe bzw. unterschiedliche Anzahl an Introns in einem Gen aufweisen, und damit ist die Möglichkeit gegeben, den Ablauf und die Koordination der Processierung eines Gens zu studieren. Weiter kann man der Frage nachgehen, ob sich bestimmte kerncodierte Faktoren spezifisch auf die Processierung von Introns einer Gruppe (z.B. Gruppe I) oder auf Introns beider Gruppen auswirken. Die Beteiligung kerncodierter Faktoren beim Processieren mt RNA in *S. cerevisiae* wurde neben verschiedenen anderen Arbeitsgruppen von Pillar et al. (1983) untersucht. Pillar et al. (1983) fanden, daß die Excision einiger Introns der *cob*-RNA und der *cox1*-RNA von Kernmutanten beeinträchtigt werden kann.

3. Das Gen für die Untereinheit 1 der Cytochromoxidase (cox1) des *S. pombe* Stammes EF1 (CBS 356): Sequenzvariationen, optionale Introns und identische Insertionsstellen mit *S. cerevisiae*

3.1. Kurze Einführung

Im vorausgehenden Teil 2 hatte man als einen der Gründe für die unterschiedlichen mt Genomlängen der *S. pombe* Stämme 50 (19,4 kbp) und EF1 (17,6 kbp), das Fehlen des 2,5 kbp langen cob-Introns im Stamm EF1 festgestellt. Ein einfaches Rechenexempel: $19,4 - 2,5 = 16,9$ zeigt, daß damit die Längendifferenz zwischen den beiden Stämmen nicht ausreichend zu erklären war. Dem Stamm EF1 fehlt zwar das cob-Intron, dennoch aber schien er noch zusätzliche Variationen gegenüber Stamm 50 zu besitzen, die zu einem Plus von 0,7 kbp führten. War dieses Plus verursacht durch längere intergene Spacerbereiche, oder hatte EF1 Genbereiche verdoppelt, besaß er einen zusätzlichen URF oder waren zusätzliche Introns vorhanden? Um dies zu klären, wurde daher zunächst ein Vergleich der Restriktionskarten der beiden *S. pombe* Stämme vorgenommen. Es zeigte sich, daß diese in großen Bereichen absolut identisch waren, was auf eine identische Organisation und Genaufbau hinweist. Drastische Abweichungen fand man im cob-Genbereich (was verständlich ist, ruft man sich das Fehlen des cob-Introns in Erinnerung) und im Bereich des cox1-Gens. Ausgehend von diesen Anhaltspunkten wurde das

cox1-Gen untersucht, und Überraschenderweise stellte sich heraus, daß trotz Fehlens des cob-Gen Introns in EF1 keineswegs eine generelle Tendenz zur Eliminierung von Intron-DNA vorliegt, denn sein cox1-Gen enthält zwei zusätzliche Introns verglichen mit Stamm 50 (also sog. "optionale Introns"). Weiter erstaunte die Tatsache, daß diese Introns an identischen Positionen inseriert wurden, wie zwei andere Introns im cox1-Gen von *S. cerevisiae*. Dies läßt eine ausgeprägte Mobilität der Introns vermuten. Möglicherweise erfolgte einst ein horizontaler Gentransfer oder Introntransfer zwischen *S. pombe* und *S. cerevisiae* mit anschließender Auseinanderentwicklung der Sequenzen (Hensgens et al., 1983). Hinweise auf große Mobilität liefern auch eine Vielzahl anderer Beobachtungen. Beispielsweise fand man, daß das zweite Intron des cox1-Gens von *S. pombe* starke Homologien zum dritten Intron des cox1-Gens von *A. nidulans* aufweist (Waring et al., 1984; Lang et al., 1984). Es gibt ferner Gene, die organismusabhängig, entweder in dem mt Genom codiert sind und/oder Kerncodiert sind. So ist in *S. cerevisiae* das var1-Gen auf dem mt Genom codiert. Kürzlich fand man ein Fragment von var1 auch im Kerngenom von *S. cerevisiae* (Farrelly und Butow, 1983; Lewin, 1983). Die Transposition von Genen (aus bzw.) in das Kerngenom wurde auch im vorhergehenden Teil 2 als eine theoretische Möglichkeit angesehen, die das Fehlen des 2,5 kbp langen cob-Introns im Stamm EF1 erklären könnte, setzt man voraus, das Intron hätte eine wichtige Funktion zu erfüllen.

Eine wichtige Funktion wäre z.B. eine Beteiligung am Processieren der *cox1*-RNA. So fand man in *S. cerevisiae*, daß das Processieren von *al4* (des vierten Introns des *cox1*-Gens) von einem intakten Produkt von *bl4* (des vierten Introns des *cob*-Gens) abhängig ist: ein Phänomen, das als "box-Effekt" bezeichnet wird (Dujardin et al., 1982).

Eine weitere Form der Mobilität mit Gene zeigt sich in *Podospora anserina*. Hier wurde beobachtet, daß das erste Intron des *cox1*-Gens in einer bestimmten Phase des Lebenscyclus (der Senescenz) excisiert wird und als Plasmid, sozusagen in "freier" Form, weiter existiert (Osiewacz und Esser, 1984). Ein Zusammenhang mit transponablen Elementen wird diskutiert.

Auf die Beschreibung allgemeiner Charakteristika von Introns wird an dieser Stelle verzichtet. Der Leser wird auf die kurze Einführung zu Teil 2 des Kapitel III verwiesen.

Die Genstruktur von *cox1* in verschiedenen Species wird kurz vorgestellt. In *S. cerevisiae* hat dieses Gen je nach Stamm meist zwischen sieben und neun Introns (Bonitz et al., 1980; Hensgens et al., 1983). Wildisolate von *N. crassa* enthalten bis zu vier Introns im *cox1*-Gen (Collins und Lambowitz, 1983), während der gewöhnlich verwendete Laborstamm 740 R81a kein Intron besitzt (Burger et al., 1982). Im *S. pombe* Stamm 50 fand man zwei Introns (Lang et al., 1983; Lang, 1984). Vergleiche hierzu auch Abb.1 und 2.

3.2. Restriktionskarte und Struktur des cox1-Gens von EF1 im Vergleich mit dem nahe verwandten Stamm 50

Über weite Bereiche sind die Restriktionskarten von Stamm EF1 (Abb.16) und Stamm 50 (Abb.2) absolut identisch (Zimmer et al., 1984). Die Kartierung der cox1-Region von EF1 parallel zu Stamm 50 enthüllte jedoch eindeutig Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen. Erstens fehlt dem Stamm EF1 das Mini-HindIII-8-Fragment des Stammes 50. Zweitens ist das HindIII-4-Fragment etwa 800 bp länger als das analoge Fragment im Stamm 50. Drittens ist das HindIII-1-Fragment circa 300 bp länger (Abb.15). Eine zusätzliche BamHI-Schnittstelle und PvuII-Schnittstelle wurden gefunden (Abb.16). Diese Unterschiede wurden durch das Auftreten zweier zusätzlicher Introns im Stamm EF1 verursacht, bzw. einer Punktmutation (T nach C Transition), die die HindIII-Schnittstelle des Mini-HindIII-8-Fragments zerstört. So stellt sich die Situation wie folgt dar: im Stamm EF1 besteht das cox1-Gen aus 5 Exons (E1, E2a, E2b, E3a, E3b) und 4 Introns (AI1, AI2a, AI2, AI3) alle der Gruppe I (Bezeichnung gemäß Michel und DuJon, 1983) (Abb.15).

Zwei Introns kommen demnach zusätzlich vor und teilen Exon 2 bzw. Exon 3 des Stammes 50 (Abb.1) in je zwei Hälften. Das erste (AI1) und das dritte (AI2) Intron sind in den beiden Organismen identisch (oder nahezu identisch im Fall von Intron AI2). Diese beiden Introns besitzen lange ORFs (open reading frames). Das zweite (AI2a) und das vierte (AI3)

Intron sind zusätzlich und haben keinen ORF einer Länge, wie er in der Regel für die Codierung eines Proteins benötigt wird (man kann allenfalls ORFs von 3-33 Aminosäuren bilden). Als Nebenprodukt der Sequenzierarbeiten in *cox1* hat sich herausgestellt, daß die zusätzliche *HpaI*-Schnittstelle (die zugleich auch eine *HindII*-Schnittstelle ist) im Stamm EF1 kurz vor dem *cox2*-Gen durch eine Punktmutation entstanden ist, nämlich einer A nach G Transition, wobei GTTAAC entstand (vgl. Abb.2 und Abb.16).

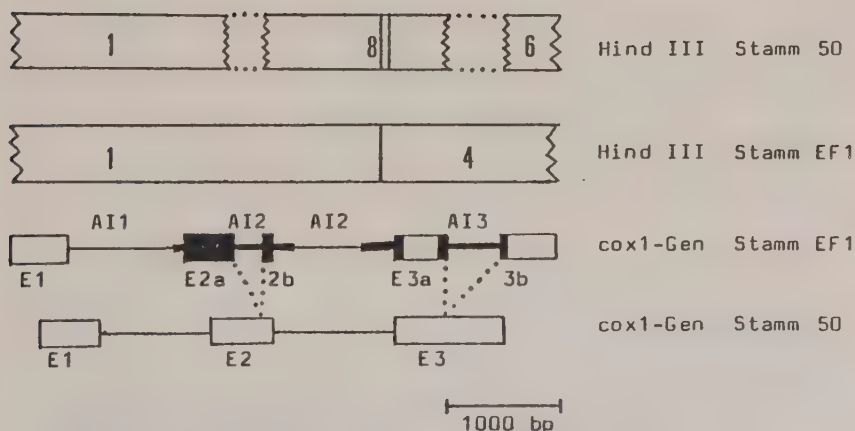


Abb.15: Struktur des *cox1*-Gens im *S. pombe* Stamm EF1 und Vergleich mit dem des Stammes 50. Als Anhaltspunkt wurde die Situation der *HindIII*-Fragmente der beiden Stämme angegeben.

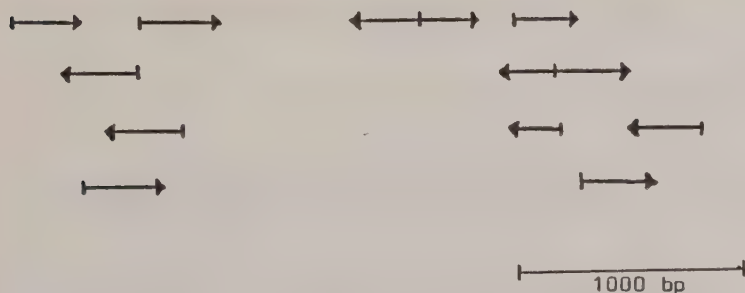
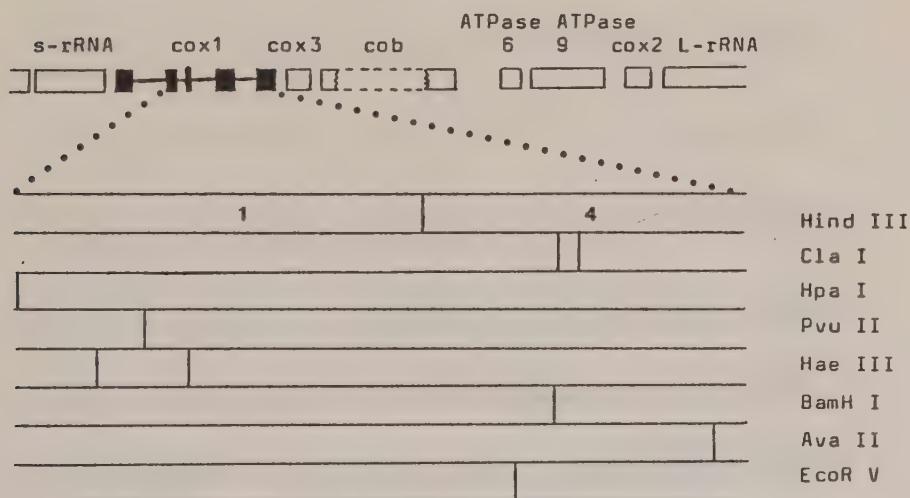
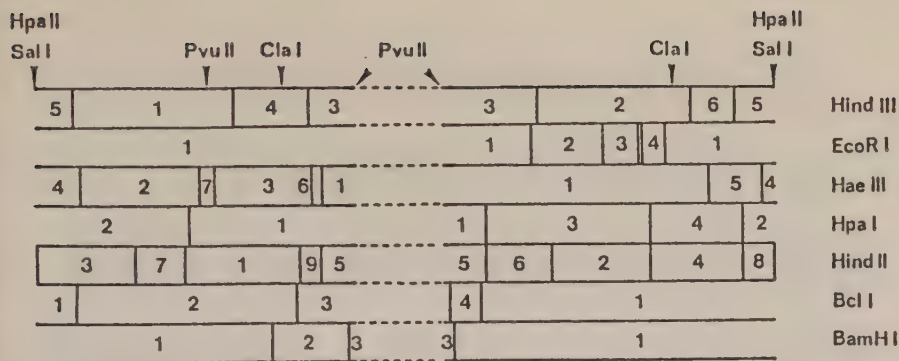
3.3. Sequenzanalyse von cox1-Genbereichen

Die Regionen, die in Abb.15 mit schwarzen Balken gekennzeichnet sind, wurden mittels der M13-Methode, bzw. alternativ der Maxam-Gilbert-Methode (Maxam und Gilbert, 1980; Sanger et al., 1977; Messing, 1983) sequenziert. Die Sequenzstrategie und die Restriktionskarte dieses speziellen Bereichs ist aus der Abb.16 ersichtlich. Die Nucleotidsequenz ist in Abb.17 gezeigt und überstreicht hauptsächlich den Bereich der zusätzlichen Introns A12a und A13, daneben auch die vollständigen Exons 2a und 2b, Teile von Exon 3a und 3b, sowie etwa die Hälfte des Introns A12. Die Nucleotidhomologie zum Stamm 50 beträgt in den sequenzierten Exonbereichen 99,6%, und keiner der Austausche führt zu einer Veränderung der Aminosäure. In den sequenzierten A12-Intronregionen beträgt die Homologie 98,6% mit zwei veränderten Aminosäuren (gly nach ser und leu nach phe) und zusätzlich einer 7 bp Insertion und einer 1 bp Deletion (vgl. Abb.17). Der GC-Gehalt des Extraintrons A12a ist 26%, der von A13 ist 28%.

Abb.16: Oben: Restriktionskarte des mitochondrialen Genoms von *S. pombe* Stamm EF1 (Daten entnommen aus Zimmer et al., 1984).

Mitte: Lage der Gene, insbesondere des cox1-Gens (schwarz hervorgehoben) und Feinkartierung der relevanten Bereiche dieses Gens.

Unten: Darstellung der Sequenzstrategie (Pfeile).



1605 AAC[↓]AAAATGA TYR PRO PRO LEU SER SER ILE THR SER HIS SER GLY
 TAT CCA CCA CTA TCA AGT ATC ACT TCT CAT AGT GGT
 1652 PRO ALA ILE ASP LEU ALA ILE LEU SER LEU GLN LEU THR GLY ILE
 CCA GCT ATT GAT CTA GCT ATT TTA AGT TTA CAA TTA ACT GGT ATT
 1697 SER SER THR LEU GLY SER VAL ASN LEU ILE ALA THR MET ILE ASN
 TCA TCA ACA TTA GGA TCA GTA AAT TTA ATA GCG ACA ATG ATT AAT
 1742 MET ARG ALA PRO GLY LEU SER LEU TYR GLN MET PRO LEU PHE ALA
 ATG AGA GCT CCA GGA TTA AGT TTA TAT CAA ATG CCA TTA TTT GCA
 1787 TRP ALA ILE MET ILE THR SER ILE LEU LEU LEU LEU THR LEU PRO
 TGG GCT ATA ATG ATT ACA TCA ATT CTA TTA CTG CTT ACT TTA CCA
 1832 VAL LEU ALA GLY GLY LEU PHE MET LEU PHE SER ASP ARG ASN LEU
 GTT TTA GCA GGT GGA TTA TTT ATG TTA TTC TCA GAT AGA AAC[↓] TTA
 1877 ASN THR SER PHE TYR ALA PRO GLU GLY GLY GLY ASP PRO VAL LEU
 AAT ACT TCA TTC TAT GCT CCT GAA GGT GGT GGT GAC CCT GTA CTT
 1922 TYR GLN HIS LEU PHE TRP PHE PHE GLY[↓]
 TAC CAA CAT TTA TTC TGG TTC TTT GGT CAACGGATGGCCAAAATAAAGAT
 1973 TGCAATGTGCTATAAGCTGGAATCTATGTATTCAATTTTAAATACTTCCACGTAAAAAT
 2033 TTAAATATTGGTAGATAATCAGCTGGTAACCAATTATCCTTTTAAATAATATTATCCTT
 2093 TTAATATGGAATATTTTATTATGGATTTAGTAGGAACCTCAGAGACTATATGCACATCAC
 2153 TTTATTTTAAAGTGAAGAGATAGTCCAAAAATATTTACATTTTAAATATTTG[↓] HIS
 CAT
 2210 PRO GLU VAL[↓] asn phe ile gly leu leu thr leu leu tyr ala gly
 CCA GAG GTC AAT TT[Ⓢ] ATA GGC CTC TTA ACG TTG CTA TAT GCT GGA
 2255 thr.....
 ACT.....

2846lys ile leu asn arg asp lys lys ile glu val
AAA ATT TTA AAT AGG GAC AAA AAA ATA GAA GTT

2903 arg leu asn tyr gln ile asp gln lys lys glu tyr leu leu ser
 CGA TTG AAC TAT CAA ATA GAT CAA AAA AAA GAG TAT CTT TTA AGT

2948 leu ile lys asp asn leu gly gly asn ile ser tyr arg lys ser
 TTA ATT AAA GAT AAT TTA GGT GGT AAT ATA GGC TAT CGA AAA AGT

2993 gln asp thr tyr tyr tyr gly ser thr ser phe gly ser ala lys
 CAA GAT ACT TAT TAT TAT GGT TCT ACT AGT TTT GGT TCA GCT AAA

3038 lys val ile asn tyr phe asp asn tyr his leu leu ser ser lys
 AAA GTT ATT AAT TAT TTT GAT AAT TAT CAT TTG CTA TCT TCT AAA

3083 tyr ile ser tyr leu lys trp arg lys ala tyr leu ile ile gln
 TAT ATT AGC TAT TTA AAA TGA AGA AAA GCT TAT CTT ATT ATT CAA

3128 glu asn lys his leu thr glu ser gly leu ser gln ile lys lys
 GAA AAT AAA CAT TTA ACA GAA TCA GGA CTT TCT CAA ATA AAA AAA

3173 leu lys thr ser ser leu ser glu glu tyr och
TTA AAA ACC TCA TCC CTA TCG GAA GAA TAT TAA TTAGATTGTGTGAT

3222 TTAAATAAAGTCCTAACAAGGGTATAAAGCTTTGAGTGTTAAAAAGAATAAATCACCT

3282 TTTGGGTGATTTTTTTCATTAAACCAAATTTATTGT TYR ILE LEU ILE MET
 TAT ATT TTA ATT ATG

3333 PRO ALA PHE GLY VAL VAL SER HIS ILE ILE PRO SER.....
 CCA GCT TTC GGT GTT GTT AGT CAC ATT ATT CCT AGT.....

3681LEU SER
TTA AGT

3687 ASN SER VAL LEU ASP ILE ALA PHE HIS ASP
 AAT TCA GTA TTA GAT ATC GCT TTC CAT GAT ATTAACCATACCTCTTA

3737 GGATTAAACTATTTTTTATATTGGAATAATAGGTATCATGAATAAATGCCACCATAAAAA

```

3797  AGGGATT CATACCTCTTTTTTGGTAAATATATTTTGGCTAACGGGAATCTTATGCTTT
3857  CCATAAGT TTTTAAATTAAAAACAACACCCAAAAGGTGTTGTACTTTAGAACTAAG
3917  ACAATACCGTGGAACCAAAAACCCAAAAGGTGTTTAGTAGGATCCGTAGAGACTAAAC
3977  GTGGCAATCGATAATTTTATTAAGTTAAATAAACTCTTAATAAATTTAACAACTAGAGG
4037  TTTAAATACCAATAGATGTGTATCGATAAGTTATAGTCCGATCCATCGTGTGAACGATG
                                     ↓
4097  TTGTATGAAATTAATTAATTTTAAATTAATTAATTAACAG  THR TYR PHE VAL
                                                    AOC TAT TTC GTT

VAL ALA HIS PHE HIS TYR VAL LEU SER MET GLY ALA LEU PHE GLY
4150  GTA GCT CAC TTC CAT TAC GTT CTG TCA ATG GGT GCA TTA TTT GGT

LEU CYS GLY ALA TYR TYR [TYR] TRP SER PRO LYS MET PHE GLY LEU
4195  CTT TGT GGT GCA TAC TAC [TAT] TGG AGT CCA AAA ATG TTT GGA TTA

```

Abb.17: Nucleotidsequenzen von *cox1*-Genbereichen aus Stamm EF1, im Detail sind das: das komplette Exon 2a und 2b, mit dem optionalen Intron A12a; etwa die Hälfte des Introns A12; das optionale Intron A13 und daran angrenzende Exonanteile 3a und 3b. Die Nummerierung bezieht sich auf die Basenposition ab 5'Ende des Gens. Die ausgetauschten Basen, verglichen mit Stamm 50 (Lang, 1984 und Lang, unveröff. Daten), sind mit einem Kreis markiert. Die gerahmten Regionen entsprechen den Insertionen des Stammes EF1. Die Spliceunkte der optionalen Introns sind mit dicken Pfeilen gekennzeichnet, die des Introns A12 (übernommen von Lang, 1984) mit dünnen Pfeilen.

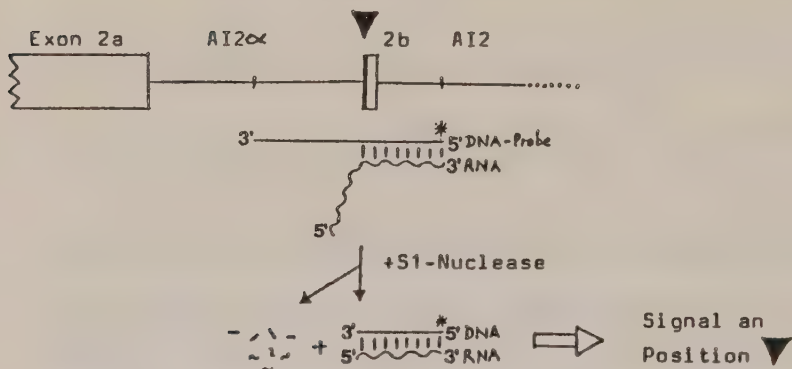
3.4. Bestimmung der Exon-Intron-Grenzen der optionalen Introns durch S1-Nuclease-Kartierung

Die Positionen der beiden optionalen Introns AI2a und AI3 im Gen für *cox1* wurden durch S1-Nuclease-Experimente bestimmt. Die Exon-Intron-Grenzen sind in Abb.17 durch dicke Pfeile gekennzeichnet. Die Positionen beider Introns folgen der Regel, daß die letzte Base des 5' liegenden Exons ein Pyrimidin, meist ein T, und die letzte Base des Introns ein G ist (Davies et al., 1983). Überraschenderweise stimmt die gefundene Position beider Extraintrons mit der Position zweier Introns im homologen *cox1*-Gen einer anderen Species überein. Extraintron AI2a ist an der selben Stelle inseriert wie das vierte Intron (ai4) des *S. cerevisiae* Stammes Kl 14-4A und Extraintron AI3 an der selben Stelle wie das sechste Intron (ai5b) desselben Stammes (Hensgens et al., 1983). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß offensichtlich Intron AI2a v o r dem Intron AI2 herausgenommen wird. Dieses Ergebnis wurde erhalten, da zunächst Schwierigkeiten bestanden, die Grenze zwischen Intron AI2a und Exon 2b (man beachte, daß dieses Exon nur 12 Nucleotide besitzt !) zu bestimmen. Weil dieses Exon so klein war, mußte man für das S1-Nuclease-Experiment eine DNA-Probe verwenden, die in das Intron AI2 hineinreicht (vgl. Abb.18) und die an diesem AI2-Ende ihre Markierung trägt. Mit dieser Probe wurde ein Signal gefunden, d.h. eine Hybridisierung mit einem Transkript hat stattgefunden, das keine Intron AI2a Bereiche mehr hat, aber Intron AI2 Bereiche noch enthält (Fall A in Abb.18). Das aber bedeutet, daß das Intron AI2a v o r dem Intron AI2

herausgenommen wird. Im umgekehrten Fall würde die Markierung der DNA-Probe von der S1-Nuclease abgedaut werden und damit hätte man kein Signal finden dürfen (Fall B in Abb.18).

A

•Fall "A": Intron AI2a wird v o r dem Intron AI2 aus dem Transkript herausgenommen.



B

•Fall "B": Intron AI2a wird n a c h dem Intron AI2 aus dem Transkript herausgenommen.

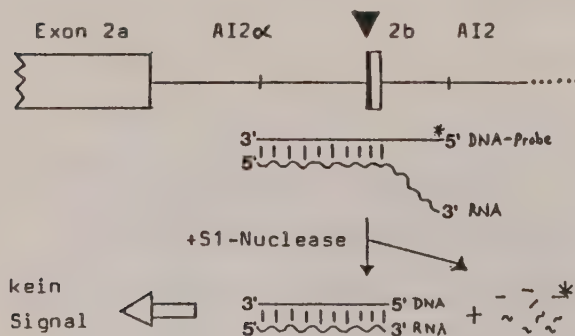


Abb.18: Veranschaulichung zu dem Ergebnis aus dem S1-Nuclease-Experiment zur Bestimmung der Grenze Intron AI2a Exon 2b.

3.5. Eine 7 bp Insertion führt zu einem Rasterschub im ORF des Introns AI2 des cox1-Gens und Nucleotidvariationen in den Exonbereichen dieses Gens

Das Intron AI2 ist sowohl im Stamm EF1 als auch im Stamm 50 vorhanden, wobei man jedoch in EF1 Abweichungen gegenüber Stamm 50 feststellen kann. Die sequenzierten Bereiche des ORFs von Intron AI2 weisen drei Basenaustausche (im folgenden immer im Vergleich mit Stamm 50) auf, die in zwei Fällen zu einer veränderten Aminosäure führen (Abb.17). Die zweite Aminosäure des ORF ist Phenylalanin (TTT) im Stamm EF1, statt Leucin (TTA) im Stamm 50 und die 250. Aminosäure dieses ORF ist in EF1 Serin (AGC), statt Glycin (GGC) im Stamm 50. Diese zwei Nucleotidaustausche haben jedoch keinen Einfluß auf die Paarungen, wie sie Michel und Dujon (1983) für Gruppe I-Introns vorschlagen.

Überraschenderweise aber findet man im 3'Bereich des ORF (etwa 30 bp vor dem 3'Ende des ORF) eine 7 bp Insertion: ...TTAAAAA..., die zu einem Rasterschub für den Rest des ORF führt, und die ein häufig benutztes TAA-Stoppcodon für diesen ORF zur Folge hat. Im Gegensatz dazu berichtete Lang (1984) für Stamm 50 ein sehr selten benütztes TAG-Stoppcodon (circa 4 bp downstream von TAA). Diese Insertion ist in Abb.19 bzw. auch Abb.17 als gerahmter Bereich zu erkennen.

A.nidulans	I	K	L	K	S	T	M	N	R	Y	N	D	T
		K	K	L	K	T	S	S	L	S	E	E	Y och
S.pombe EF1	AAA	AAA	TTA	AAA	ACC	TCA	TEC	CTA	TCG	GAA	GAA	TAT	TAA
													
S.pombe 50	AAA	AAA	CCT	CAT	CCC	TAT	CGG	AAG	AAT	ATT	AAT	TAG	
	K	K	P	H	P	Y	R	K	N	I	N	och	

Abb.19: Die 7 bp Insertion im 3'Bereich des ORF von Intron A12 des S. pombe Stammes EF1, verglichen mit den homologen Sequenzen des Stammes 50 (Lang, 1984). Zusätzlich Vergleich der Aminosäuren mit A. nidulans (Waring et al., 1984).

Das Auftreten einer 7 bp Insertion ist recht merkwürdig, bedenkt man die ansonsten extrem hohe Homologie der ORF-Sequenzen von 99,2%. Es weist darauf hin, daß dieser 3'Bereich des ORFs keine sehr wichtige Funktion erfüllen muß. Da man für diesen ORF die Hypothese aufgestellt hat, daß er möglicherweise für ein Protein codiert, das eine Rolle in der Processierung von Transkripten inne hat (Lang et al., 1983), würde somit auch die Aminosäurezusammensetzung des 3'Bereichs dieses Proteins nicht von entscheidender Bedeutung sein.

Im Nicht-ORF-Bereich des Introns A12 kommen zwei Basenaustausche vor und eine 1 bp Deletion. Die beiden Basenaustausche sind eine A nach T Transversion (Position 3218 in Abb.17) und eine T nach C Transition (Position 3254 in Abb.17). Die Deletion von einem T wurde nach Position 3298 der Abb.17 festgestellt.

Die Gesamtkonservierung auf Nucleotildebene ist für Intron AI2 98,6%, und damit vergleichbar mit dem Konservierungsgrad der Exonregionen des *cox1*-Gens (etwa 99,6%).

Ein Alignment der kompletten Sequenzen von Exon 2a und 2b des Stammes EF1 mit dem Exon 2 des Stammes 50 ließ einen einzigen Basenaustausch (Position 1873 in Abb.17) erkennen. Zwei Austausche wurden in den Exon 3a und 3b Bereichen (Positionen 4140 und 4212 in Abb.17) gefunden. Wie erwähnt, sind alle diese Mutationen in den Exonregionen stille Mutationen. Angemerkt sei in diesem Zusammenhang, daß auch in den sequenzierten Exonbereichen des *cox3*-Gens (H. Trinkl, unveröff. Daten) ausschließlich stille Mutationen auftreten. Eine Besonderheit jedoch findet man noch im Exon 3b des Stammes EF1, nämlich das Auftreten einer 3 bp Insertion, d.h. das Auftreten einer zusätzlichen Aminosäure verglichen mit Stamm 50 (Abb.20 und Abb.17). Diese 26. Aminosäure des Exon 3b von Stamm EF1, die in der homologen Sequenz des Stammes 50 fehlt, kommt jedoch, wie man aus der Abb.20 ersehen kann, auch bei allen anderen untersuchten homologen Sequenzbereichen von Organismen wie *A. nidulans*, *N. crassa*, *S. cerevisiae*, HeLa-Zellen vor. Die Ausnahme stellt also der Stamm 50 mit der fehlenden Aminosäure dar. Im Stamm EF1 ist diese Aminosäure ein Tyrosin (TAT). In Abb.20 ist sie mit einem Kreis gekennzeichnet. Weiter wurde in Abb.20 ein anderes Alignment des Stammes 50 vorgeschlagen, indem die von Lang (1984) eingeführte Auslassung an eine andere Posi-

tion gesetzt wurde und damit den neuen Erkenntnissen, die man aus der Untersuchung des Stammes EF1 gewonnen hat, besser Rechnung getragen wird.

S.pombe EF1		S	M	G	A	L	F	G	L	C	G	A	Y	Y	Y	W	S	P	
S.pombe 50		S	M	G	A	L	F	G	L	C	G	A	Y	Y	-	W	S	P	
A.nidulans		S	M	G	A	V	F	A	L	F	S	G	W	Y	L	W	I	P	
N.crassa		S	M	G	A	V	F	A	M	F	S	G	W	Y	H	W	V	P	
S.cerevisiae		S	M	G	A	I	F	S	L	F	A	G	Y	Y	Y	W	S	P	
Hela		S	M	G	A	V	F	A	I	M	G	G	F	I	H	W	F	P	

Abb.20: Aminosäuren des Exon 3b Bereichs vom cox1-Gen des Stammes EF1 mit der zusätzlich gefundenen Aminosäure (durch Kreis gekennzeichnet) in Relation zu Stamm 50 und Vergleich mit homologen Regionen in anderen Organismen (Daten von Stamm 50 entnommen aus Lang, 1984, hier können auch die Referenzen für die anderen Species gefunden werden). Identische Aminosäuren sind durch Punkte gekennzeichnet.

Der Vollständigkeit halber sollte noch ein Basenaustausch angeführt werden, der 7 bp vor dem 5'Anfang des Exons 2a, also in der Nicht-ORF-Region des Introns A11, liegt (Position 1608 in Abb.17).

3.4. Besondere Merkmale der optionalen Introns AI2a und AI3 des cox1-Gens von EF1; identische Insertionsstellen und Gruppe I Klassifizierung

3.4.1. Allgemeine Bemerkungen

Identische Insertionsstellen von Introns verschiedener Species in homologen Genbereichen wurden in der Literatur in drei Fällen berichtet. Die Introns der L rRNA-Gene von *N. crassa* Mitochondrien (Burke und RajBhandary, 1982), von *S. cerevisiae* Mitochondrien (Dujon, 1980), von *Tetrahymena* Kerngenomen (Kan und Gall, 1982) und von *Physarum polycephalum* (Nomiya et al., 1981) sind an der selben Stelle inseriert, zeigen aber z.B. zwischen *N. crassa* und *S. cerevisiae* so gut wie keine Sequenzhomologien. Das dritte Intron des cob-Gens von *S. cerevisiae* (Lazowska et al., 1981) und das einzige cob-Intron von *A. nidulans* (Waring et al., 1981) sind ebenfalls an identischen Stellen inseriert und weisen auch kaum Sequenzhomologien auf. Der dritte Fall wurde berichtet von Lang et al. (1984) und Waring et al. (1984), die eine identische Insertion des zweiten Introns vom cox1-Gen des *S. pombe* Stammes 50 (dieses AI2-Intron besitzt, wie erwähnt auch der Stamm EF1) und des dritten Introns vom cox1-Gen der Species *A. nidulans* vorfanden. Zudem bestand in diesem Fall eine unerwartet hohe Homologie zwischen diesen beiden Introns. Das neuestes Beispiel für identische Intron-Insertionsstellen ist das im folgenden beschriebene Auftreten der optionalen Introns AI2a und AI3 im cox1-Gen des *S. pombe* Stammes EF1 an identischen Stellen wie zwei andere

cox1-Introns der Species *S. cerevisiae*. In diesem Beispiel handelt es sich um Introns, die einer bestimmten Gruppe (der Gruppe I) zuzuordnen sind. Wie in der kurzen Einführung zum Teil 2 ausführlich erläutert, nahmen Michel und Dujon (1983) eine Einteilung der Introns in zwei Hauptgruppen auf Grund charakteristischer Gemeinsamkeiten vor.

3.6.2. Optionales Intron AI2a

Intron AI2a ist an der selben Position inseriert wie das vierte Intron (aI4) im homologen cox1-Genbereich von *S. cerevisiae* (Bonitz et al., 1980). Während jedoch aI4 eine Länge von 1009 bp hat und einen langen ORF von 948 Nucleotiden (=316 Aminosäuren), hat das Intron AI2a von EF1 nur 258 bp und ein ORF von einer Länge, wie er in der Regel für die Codierung eines Proteins benötigt wird, kann nicht gefunden werden. In allen 6 möglichen Leserahmen treten wiederholt TAA-Stopcodons auf und so lassen sich, wenn überhaupt, nur sehr kurze Aminosäurestrecken bilden (maximal 24 Aminosäuren). Intron aI4 gehört zu den Introns der Gruppe I (nach der Einteilung von Michel und Dujon, 1983). Intron AI2a läßt sich trotz seiner enormen Kürze und dem fehlenden ORF ebenfalls eindeutig dieser Gruppe I zuordnen (Abb.21a und 21b). Es zeigt perfekte Homologie in den charakteristischen Gruppe I-Merkmalen mit aI4 und außerdem findet man zwischen den 5' Bereichen dieser beiden Introns große Übereinstimmung (Abb.21a und 21b) bezüglich Primär- und

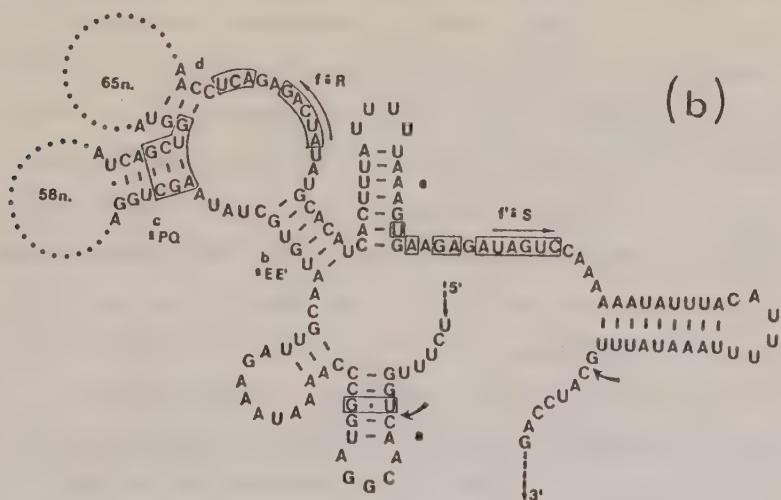
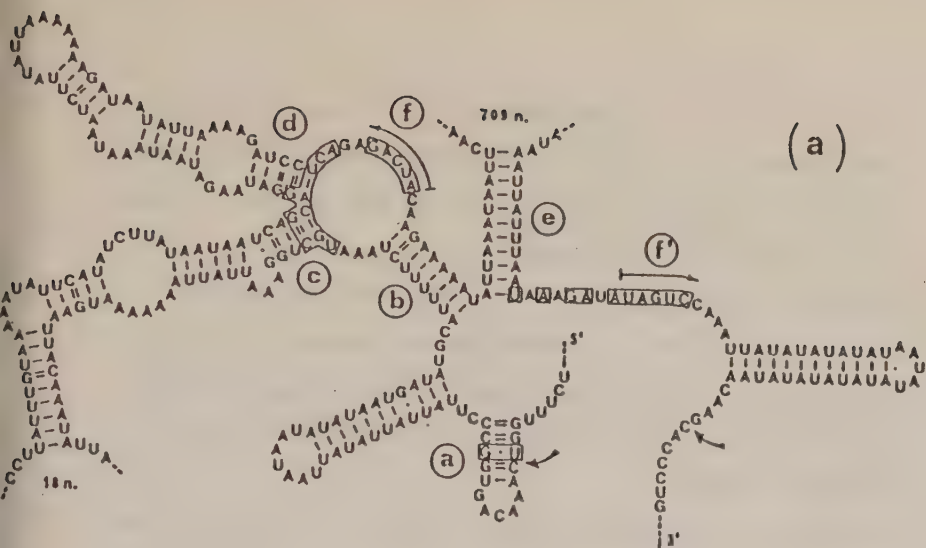


Abb.21a: Sekundärstrukturmodell des Gruppe I-Introns a14 von *S. cerevisiae* (Bonitz et al., 1980), aufgestellt von Michel und Dujon (1983). Die dicken Pfeile geben die Spliceunkte an. Gerahmte Bereiche geben invariante Regionen von *S. cerevisiae* Gruppe I Introns an. Die fünf universellen Gruppe I Helices sind mit a-e benannt. Die dünnen Pfeile zeigen die mögliche Paarung der Regionen f und f' an.

Abb.21b: Sekundärstrukturmodell des Gruppe I-Introns A12a von *S. pombe* Stamm EF1. Kennzeichnungen analog zu 21a.

Sekundärstruktur. Die restlichen Sequenzen zwischen diesen beiden Introns AI2a und aI4 sind jedoch völlig verschieden. Die Längendifferenzen, d.h. die 751 bp mehr in aI4, liegen fast vollständig in dem Loop, der durch den Stem "e" gebildet wird (Abb.21a und 21b). Waring und Davies (1984) befaßten sich ebenfalls ausführlich mit Merkmalen von Gruppe I-Introns. Sie stellten fest, daß in diesem Loop in den meisten Fällen der Hauptanteil des ORFs (falls überhaupt vorhanden) liegt.

Betrachtet man das Gruppe I-Modell (Abb.21a) von Michel und Dujon (1983), so wären leichte Abänderungen angebracht. So wurde in EF1 Intron AI2a ein kompensatorischer Basenaustausch, verglichen mit aI4, in der PQ-Region (= "c", Abb.21b) gefunden. Dies deutet daraufhin, daß die letzte Paarung im Stem "d" (= "R"-Region, Abb.21b) nicht existiert und dafür eine zusätzliche Paarung im Stem "c" (= "PQ"-Paarung, Abb. 21b) vorzuschlagen wäre, wie in der Abb.21b gezeigt.

In diesem Zusammenhang sollte man die Untersuchungen von Waring und Davies (1984) erwähnen. Sie untersuchten 19 Introns der Gruppe I hinsichtlich der Sequenzen in den P-, Q-, R-, und S-Regionen (wobei die nach Waring und Davies, 1984 benannte PQ-Paarung dem "c"-Stem von Michel und Dujon, 1983 entspricht und die RS-Paarung der "ff'"-Paarung) und stellten eine daraus resultierende Konsensus-Sequenz für diese Regionen auf (Abb.23). Sie fanden, daß 17 von den 19 untersuchten Introns an der oben diskutierten Position ein Adenin (A) in der Q-Region haben, das entweder mit dem Uracil (U) der R-Region, oder mit dem U der P-Region paaren

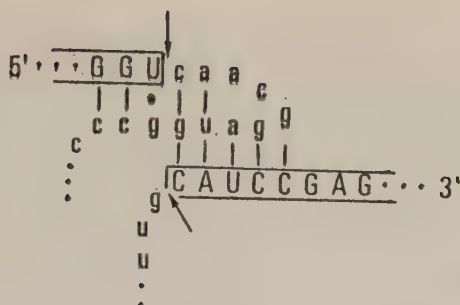


Abb.22: Internal guide RNA Sequenz (IGS) des optionalen Introns AI2a der Gruppe I.

	P	Q
Konsensus-Sequenz:	11171316101214131811 A <u>U G C U G G</u> A A A	14191511 91612171610 A A <u>U C A G C A G G</u>
	U G A A A G U 7 3 6 5 5 5 5	U C U U C C 5 3 5 7 3 7
Sequenz von AI2α:	A <u>(A) G C U G G A A A</u> : :.....:	A A <u>U C A G C</u> <u>(U) G G</u> : :.....:
	R	S
Konsensus-Sequenz:	161618 10 1919181916 17 U C A G A G <u>A C U A X A</u>	1916171613181619181918 A A G A U A <u>U A G U C</u>
	U A C 3 6	U G 3 3
Sequenz von AI2α:	U C A G A G A C U A X A	A A G A <u>(G) A U A G U C</u>

Abb.23: Konservierte Sequenzen der Gruppe I-Introns (der Arbeit von Waring und Davies, 1984 entnommen). Die Unterstreichungen in den Konsensus-Sequenzen zeigen die Basen an, die gewöhnlich die PQ-Paarungen (= c) bzw. die RS-Paarungen (= ff') ausbilden. Die Konsensus-Sequenzen zeigen die häufigsten Basen, mit der Zahl der Häufigkeiten in den untersuchten 19 Introns und darunter sind Basen mit ihrer Häufigkeit aufgeführt, die nicht so verbreitet vorkommen. Im Vergleich zu diesen Konsensus-Sequenzen sind in der jeweils letzten Zeile die Sequenzen von Intron AI2a angeführt.

kann. Sie schlagen vor, daß es sein kann, daß solch eine alternative Paarung eine Rolle in der Processierungsreaktion haben könnte. Dieser Vorschlag kann nicht aufrechterhalten werden, wie durch den kompensatorischen Basenaustausch im Intron AI2a des Stammes EF1 nachgewiesen wurde.

Daher ist nur die Möglichkeit einer PG-Paarung gegeben. Zweitens, läßt ein anderer kompensatorischer Basenaustausch vermuten, daß der Stem "e" durch eine weitere Paarung verlängert wird (Abb.21b).

Die vorgeschlagenen Konsensus-Sequenzen für Gruppe I-Introns nach Waring und Davies (1984) sind in Abb.23 dargestellt. Die Sequenz dieser Regionen im Intron AI2a sind aufgeführt und die kompensatorischen Basenaustausche sind gekennzeichnet.

Für die Gruppe I-Introns wurde von Davies et al. (1982) die Möglichkeit zur Bildung einer "internal guide RNA sequence" (IGS) berichtet. Diese IGS mag erforderlich sein für den Spleißmechanismus, da hierbei die Intronenden präzise aneinander gelagert, die Exonenden einander nahe gebracht werden und wieder ligiert werden können (Abb.22).

Für das Intron AI2a läßt sich eine solche IGS finden (Abb. 22).

Es ist aus der Abb.21b offensichtlich, daß dieses kleine Intron von 258 bp Länge perfekt in das Gruppe I-Modell paßt. Es ist damit der kleinste Vertreter dieser Gruppe und läßt Schlüsse auf die Minimalanforderungen an die Gruppe I-Introns zu.

Die Möglichkeit, daß es ein kleines Bruchstück des sehr viel größeren Introns a14 von *S. cerevisiae* ist, erscheint aus einigen Gründen nicht sehr wahrscheinlich. So liegen die R- und S-Sequenzen (= "f" und "f'") in *S. cerevisiae* im ORF, in EF1 fehlt ein ORF. Die Funktionen, die man für die möglichen Produkte eines ORFs diskutiert, sind eine Maturase-ähnliche Aktivität (Clark-Walker, 1985) oder die Codierung für ein ribosomales Protein wie im Falle des Introns der L rRNA in *N. crassa* (Burke und RajBhandary, 1982). Diese Möglichkeiten bestehen für EF1 nicht. Jedoch sollte darauf hingewiesen werden, daß direkte Nachweise für eine Translation dieser Proteine von den meisten dieser ORFs fehlen (Hensgens et al., 1983). Möglicherweise aber gab es in EF1 einst einen ORF, der seine Funktion verloren hat, bzw. zerstört wurde durch Mechanismen wie Rekombinationen, Mutationen, Intron-DNA-Rearrangements.

Die Sequenzen (außer denen der konservierten Regionen) der beiden Introns A12a aus *S. pombe* Stamm EF1 und a14 aus *S. cerevisiae* unterscheiden sich völlig.

In *S. cerevisiae* ist das Processieren von a14 abhängig von einem intakten b14 (das vierte Intron des cob-Gens) Produkt (Dujardin et al., 1982). EF1 besitzt im cob-Gen kein Intron. Für das Processieren des Introns A12a muß ein anderer Mechanismus angenommen werden.

Es gibt eindeutige Hinweise dafür, daß für einige Gruppe I-Introns sog. "Self-Splicing" vorliegt, d.h. daß das Intron sich selbst im proteinfreien Ansatz herauschneiden kann. So

wurde dieses Phänomen z.B. für das nucleäre L rRNA-Intron von *Tetrahymena* nachgewiesen (Cech et al., 1981; Zaugg et al., 1983; Kruger et al., 1982), und auch für das erste cob-Gen-Intron von *N. crassa* (Garriga und Lambowitz, 1984). Bedenkt man, daß das Intron AI2a des *cox1*-Gens von *S. pombe* Stamm EF1 keinen ORF besitzt, der Spleißfunktionen inne haben könnte, so würde man annehmen, daß dieses Intron ein möglicher Kandidat für "Self-Splicing"-Mechanismen ist. Durch seine geringe Größe könnte man so die minimalen Anforderungen an ein derartiges System ableiten und damit einen wichtigen Beitrag zur Ermittlung der relevanten Sekundärstrukturen und Sequenzen liefern. Waring et al. (1985) klonierten das Gruppe I-Intron des L rRNA-Gens von *Tetrahymena thermophila* und schleusten es in *E. coli* ein. Sie führten mit diesem Intron in-vitro-Mutagenese durch und beobachteten, wann es zu einer Behinderung der "Self-Splicing"-Eigenschaften kommt. Damit waren Rückschlüsse auf wichtige Regionen möglich. Die Ergebnisse dieser in-vitro-Mutagenese Versuche fanden in vivo Bestätigung durch die Untersuchung von Gruppe I-Intron Mutanten (Holl et al., 1985; Weiss-Brummer et al., 1983). Das bedeutenste Ergebnis aus diesen Studien war der Beweis, daß eine intakte RS-Paarung (= ff') für das "Self-Splicing" Bedingung ist.

9.6.3, Optionales Intron A13

Intron A13 ist an der identischen Stelle inseriert, wie das sechste Intron im homologen *cox1*-Gen (a15b) des *S. cerevisiae* Stammes KL 14-4A (Hensgens et al., 1983). Während das Intron a15b jedoch eine Länge von 1535 bp hat und einen langen ORF besitzt, hat das Intron A13 des *S. pombe* Stammes EF1 nur 421 bp und wiederum läßt sich kein ORF von einer Länge finden, wie er in der Regel für die Codierung eines Proteins benötigt wird. Es gehört wie Intron a15b zu den Introns der Gruppe I (Abb.21a und 24), aber man findet bei diesem Intron A13 eine Vielzahl kompensatorischer Basenaustausche in den konservierten Regionen, speziell in den P- und Q-Regionen. Neben den konservierten Bereichen weisen die Sequenzen dieser beider Introns A13 und a15b keinerlei signifikante Homologie auf, auch nicht im 5' Bereich, wie es im Fall des Introns A12a zutraf, abgesehen von der erstaunlichen Ausnahme einer Strecke von 20 bp. 17 bp dieser 20 bp Strecke sind nämlich in beiden Introns identisch. Die Strecke beinhaltet:

.....TAAGACAATaCCGTGgaAAC.....

(wobei die identischen Basen mit Großbuchstaben angegeben sind).

Die Längenunterschiede, d.h. die zusätzlichen 1114 bp im Intron a15b, liegen ausschließlich in dem Bereich zwischen der R-Region (= "f") und dem 3'Spliceunkt.

Betrachtet man das Modell für die Introns der Gruppe I von Michel und Dujon (1983), so sollte man die im vorhergehenden

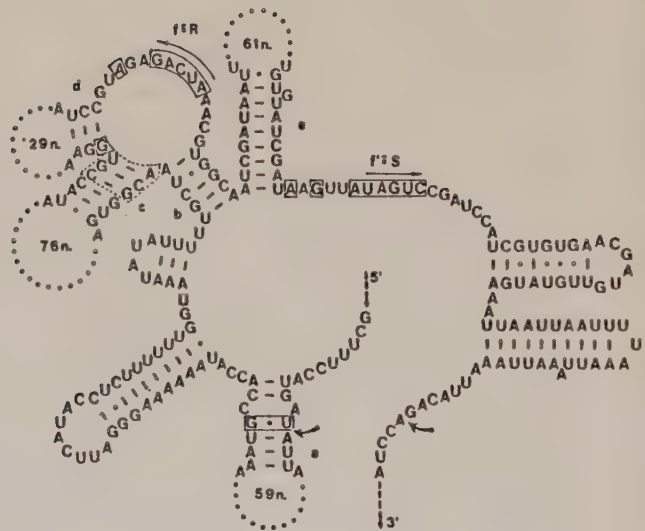


Abb.24: Sekundärstrukturmodell des optionalen Introns A13 des *S. pombe* Stammes EF1. Kennzeichnungen analog zu Abb.21a bzw. 21b.

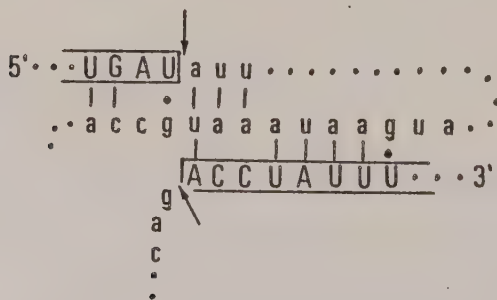


Abb.25: Internal Guide RNA Sequenz (IGS) des optionalen Introns A13 der Gruppe I:

lich, daß nur die Sekundärstruktur in den P- und Q-Regionen wichtig ist und hier die Sequenz keine entscheidende Rolle für eine strukturelle und/oder katalytische Funktion spielt. Die Sequenzen der R- und S-Regionen (= "f" und "f'") stimmen relativ gut mit den von Waring und Davies (1984) aufgestellten Konsensus-Sequenzen überein. In der möglichen Paarungsstrecke lassen sich keine Austausche nachweisen (Abb.26). Auch für das Intron AI3 ist es höchst unwahrscheinlich, daß es ein Bruchstück des dreimal so langen Introns aI5b ist. Obwohl die 20 bp Strecke mit 17 homologen Nucleotiden sehr erstaunt, so zeigen doch alle übrigen Sequenzen keinerlei signifikante Homologie. Die Frage bleibt offen, woher dieses auffallend homologe Sequenzstück stammt, ob es für eine bestimmte Funktion vonnöten ist, oder ob es sich hierbei um eine rein zufällige Übereinstimmung handelt. Oder sollte es, trotz allem, eine Verbindung zwischen den beiden Introns AI3 des *cox1*-Genes von *S. pombe* Stamm EF1 und aI5b des *cox1*-Genes von *S. cerevisiae* Stamm KL 14-4A widerspiegeln. Beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen kann man dafür keine Erklärung finden. Aus denselben Gründen, wie sie für das Intron AI2a diskutiert wurden, mag auch dieses Intron ein Kandidat für einen "Self-Splicing"-Mechanismus sein.

3.7. Flankierende Exonregionen der beiden optionalen Introns

Betrachtet man die Situation an den flankierenden Exonregionen dieser beiden zusätzlichen Introns in Stamm EF1 bzw. in den homologen Bereichen des Stammes 50, so kann für beide Fälle festgestellt werden, daß es durch die Introninsertion zu keiner Beeinträchtigung der Exonflanken im Stamm EF1 kommt. Die Exonsequenzen, welche die Introns flankieren, weisen nur einen einzigen Basenaustausch im Exon 3b auf, und hierbei handelt es sich wieder um eine stille Mutation, d.h. die Aminosäure wird dadurch nicht verändert. Die Situation an den Flanken dieser Introns fand so große Beachtung, weil man bei dem optionalen Intron im cob-Gen des Stammes 50 gefunden hat, daß diese Insertion offensichtlich gehäufte Sequenzunterschiede zur Folge hatte, wie im zweiten Teil des Kapitel III näher ausgeführt. Dieses Auftreten gehäufter Sequenzunterschiede in den flankierenden Exonregionen wurde nur noch in einem weiteren Fall beobachtet, dem *cox1*-Gen von *S. cerevisiae* Stamm KL 14-4A (Hensgens et al., 1983). Bei den zwei in diesem Teil besprochenen optionalen Introns, sowie auch bei den meisten der untersuchten anderen Fälle, tritt dieses Phänomen nicht zu Tage, die Exonflanken zeigen keine gehäufte Austauschrate.

3.8. Abschließende Betrachtungen

Schließt man die Ergebnisse von Teil 2 über die Situation im cob-Gen in eine Betrachtung der Genomorganisation des *S. pombe* Stammes EF1 mit ein, so findet man eine Konstellation vor, wie sie in Abb.27 im Vergleich mit Stamm 50 dargestellt ist. Der innere Balkenkreis spiegelt die Genomorganisation von *S. pombe* Stamm 50 wider. Die äußeren Balken zeigen die variablen Genstrukturen des Stammes EF1. Man erkennt, daß der Stamm EF1 ein kontinuierliches cob-Gen besitzt, und daß das 2,5 kbp lange Intron von Stamm 50 fehlt. Das cox1-Gen dagegen weist zwei zusätzliche Introns von 0,45 und 0,25 kbp Länge auf, die Exon 2, bzw. Exon 3 des homologen Gens von Stamm 50 in je zwei Hälften teilen. Das bedeutet, daß das cox1-Gen in EF1 vier Introns besitzt, in Stamm 50 zwei Introns. Damit stellt sich zusammengefaßt der Introngehalt dieser beiden *S. pombe* Stämme wie folgt dar:

	Stamm 50	Stamm EF1
cob-Gen	1	-
cox1-Gen	2	4

Mit dem Auftreten der optionalen Introns in diesen beiden Genen kann die Längendifferenz von 1,8 kbp der mt Genome dieser Stämme (19,4 kbp Stamm 50; 17,6 kbp Stamm EF1) vollständig erklärt werden.

Die Ergebnisse aus diesem Teil der Arbeit bieten die Grundlage, in zwei verschiedenen Richtungen weiterzuforschen. Als erstes wäre die schrittweise Reduktion von Introns bis hin zu intronlosen Stämmen (wie in Teil 2 angedeutet) durch

Kreuzung verschiedener Stämme zu versuchen, um damit Hinweise auf die physiologische Bedeutung optionaler Introns abzuleiten. Als zweites wäre interessant, ob bzw. welche Introns zu einem "Self-Splicing"-Mechanismus befähigt sind. Das extrem kurze Intron AI2a des cox1-Gens von Stamm EFi könnte in ein Plasmid oder in einen Phagen inkloniert und in *E. coli* eingeschleust werden. Wird das Intron in diesem System herausgeschnitten, so könnte man durch gezielte in-vitro-Mutagenese dieses Introns die Strukturen feststellen, die bei Mutation den Mechanismus des "Self-Splicings" einschränken, also für den Prozeß von Bedeutung sind.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurden Gene des mt Genoms der *S. pombe* Stämme 50 und EF1 (CBS 356).

Das Gen der kleinen rRNA des *S. pombe* Stammes 50 liegt in 3'Richtung vom Gen der großen rRNA und wird von diesem durch circa 300 bp getrennt. Es hat eine Länge von 1422 bp und sein GC-Gehalt beträgt 34%. Hinweise für ein Intron liegen nicht vor. Flankiert wird dieses Gen von tRNAs, wobei die am 5'Ende liegende tRNA unmittelbar anschließt. Einen Promotor oder Leader findet man nicht vor. Am 3'Ende des S rRNA-Gens fällt ein Poly C-Cluster (9 Cytosinnucleotide) auf, das vermutlich ein Processierungssignal darstellt. Ein Alignment mit dem S rRNA-Gen von *E. coli* weist etwa 42% Homologie auf. Bezüglich seiner Sekundärstruktur verhält es sich hoch konserviert, denn es erfüllt nahezu perfekt die Bedingungen des "Allgemeinen Sekundärstruktur Modells". Hochkonserviert ist dieses Gen der S rRNA auch zwischen den beiden *S. pombe* Stämmen 50 und EF1 (<1% Austauschrate).

Die zwischen den beiden Stämmen beobachteten Differenzen in den Genomlängen (Stamm 50: 19,4 kbp; Stamm EF1: 17,6 kbp) von etwa 10% werden verursacht durch Variationen in den Genen für *cob* und *cox1*. Das *cob*-Gen des Stammes 50 besitzt ein einziges 2,5 kbp langes Intron der Gruppe II mit ORF. Dem Stamm EF1 fehlt dieses Intron, er weist ein kontinuierliches *cob*-Gen auf. Die Homologie zwischen den Sequenzen der Exonbereiche ist sehr hoch (>99%), außer in der Region der Introninsertion im Stamm 50. Hier findet man gehäufte Sequenzunterschiede vor.

Während dem *cob*-Gen des Stammes EF1 ein Intron fehlt, enthält sein *cox1*-Gen vier Introns, also zwei zusätzliche Introns (optionale Introns) verglichen mit Stamm 50. Diese beiden optionalen Introns teilen die homologen Bereiche von Exon 2 bzw. Exon 3 des Stammes 50 in je zwei Hälften. Sie sind außerordentlich kurz (AI2a: 258 bp; AI3: 421 bp) und gehören den Gruppe I-Introns an, wobei das Intron AI2a mit 258 bp der kleinste bekannte Vertreter dieser Gruppe ist. Beide optionale Introns lassen keinen ORF von einer Länge erkennen, wie er in der Regel für die Codierung eines Proteins benötigt wird. Überraschenderweise sind diese Introns an den selben Stellen im *cox1*-Gen inseriert wie zwei *cox1* Introns einer anderen Species (*S. cerevisiae*). Eine signifikante Homologie zwischen den an der selben Stelle inserierte Introns besteht jedoch nicht. Es lassen sich an den Regionen der Introninsertion keine gehäuften Sequenzunterschiede feststellen. Zusätzlich zeigt das *cox1*-Gen des Stammes EF1 Variationen im Intron AI2, das beiden Stämmen eigen ist. Die auffälligste ist die einer 7 bp Insertion, die zu einem Rasterschub im 3'Teil des ORF dieses Introns führt. Die Homologie in den Strukturgebieten der homologen Gene ist ansonsten sehr hoch (>99%).

Durch den unterschiedlichen Introngehalt der beiden Stämme läßt sich die Längendifferenz zwischen deren mt Genomen ($19,4 - 2,5 + 0,45 + 0,25 = 17,6$) vollständig erklären.

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts danken, die durch ihre Hilfsbereitschaft an der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. K. Wolf für die Betreuung dieser Arbeit, sein stetes Interesse und das entgegengebrachte Verständnis und Vertrauen, das zu einer harmonischen Zusammenarbeit führte.

Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Genetik und Mikrobiologie.

Der "Deutschen Forschungsgemeinschaft", mit deren Unterstützung meine finanzielle Grundlage gesichert war.

Meinen beiden "Mit-Dissertanten" Sonja Distler und Fred Ahne für wertvolle Diskussionen, ihre stete Hilfsbereitschaft, Anteilnahme in "Freud' und Leid" und nicht zuletzt für ihr freundliches und aufgeschlossenes Wesen, das ein Arbeiten in angenehmer Atmosphäre möglich machte.

Alwine, J.C., Kemp, P.J., Stark, G.P. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5350-5354.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G. (1981). *Nature* 290, 457-465.

Anziano, P.Q., Perlman, P.S., Lang, B.F., Wolf, K. (1983). *Curr. Genet.* 7, 273-284.

Beach, D., Nurse, P. (1982). *Nature* 290, 140-142.

Belcour, L., Begel, O., Mosse, M.-O., Vierny, C. (1981). *Curr. Genet.* 3, 13-21.

Bendich, A.J. (1982). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 477-481.

Bernardi, G., Baldacci, G., Bernardi, G., Faugeron-Fonty, G., Gaillard, C., Goursot, R., Huyard, A., Mangin, M., Marotta, R., deZamaroczy, M. (1980). In "The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome" (A.M. Kroon and C. Saccone, eds.), Elsevier, Amsterdam, 21-36.

Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., Clayton, D.A. (1981). *Cell* 26, 167-180.

Birky, C.W., Jr., Acton, A.R., Dietrich, R., Carver, M. (1982). In "Mitochondrial Genes" (P. Slonimski, P. Borst, G. Attardi, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 333-348.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S. (1977). *Gene* 2, 95-113.

Bonitz, S.G., Coruzzi, G., Thalenfeld, B.E., Tzagoloff, A. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 11927-11941.

Bonitz, S.G., Homison, G., Thalenfeld, B.E., Tzagoloff, A. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 6268-6274.

Borst, P., Grivell, L.A. (1978). *Cell* 15, 705-723.

Borst, P., Grivell, L.A. (1981). *Nature* 290, 443-444.

Bos, J.L., Heyting, C., Borst, P., Arnberg, A.C., Van Bruggen, E.F.J. (1978). *Nature* 275, 336-338.

Brown, T.A., Davies, R.W., Ray, J.A., Waring, R.B., Scazzocchio, C. (1983). *EMBO. J.* 2, 427-435.

Brown, T.A., Waring, R.B., Scazzocchio, C., Davies, R.W. (1985). *Curr. Genet.* 9, 113-117.

- Burger, G., Scriven, C., Machleidt, W., Werner, S. (1982). EMBO. J. 1, 1385-1391.
- Burke, J.M., RajBhandary, U.L. (1982). Cell 31, 509-520.
- Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Ebel, J.-P. (1978). FEBS Lett. 94, 152-156.
- Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Ebel, J.-P. (1979). Eur. J. Biochem. 100, 399-410.
- Cech, T.R., Zaugg, A.J., Grabowski, P.J. (1981). Cell 27, 487-496.
- Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. (1978). J. Bacteriol. 134, 1141-1156.
- Christianson, T., Edwards, J., Levens, D., Locker, J., Rabinowitz, M. (1982). J. Biol. Chem. 257, 6494-6500.
- Clark-Walker, G.D., Sriprakash, K.S., McArthur, C.R., Azad, A.A. (1980). Curr. Genet. 1, 209-217.
- Clark-Walker, G.D., McArthur, C.R., Daley, D.J. (1981). Curr. Genet. 4, 7-12.
- Clark-Walker, G.D., Sriprakash, K.S. (1982). In "Mitochondrial Genes" (P. Slonimski, P. Borst, G. Attardi, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 349-354.
- Clark-Walker, G.D. (1985). In "The Evolution of Genome Size" (T. Cavalier-Smiths, ed.), John Wiley & Sons, Sussex, in press.
- Clewell, D.B. (1972). J. Bacteriol. 110, 667-676.
- Collins, R.A., Lambowitz, A.M. (1983). Curr. Genet. 4, 131-133.
- Davies, R.W., Waring, R.B., Ray, J.A., Brown, T.A., Scazzocchio, C. (1982). Nature 300, 719-724.
- Davies, R.W., Waring, R.B., Brown, T.A., Scazzocchio, C. (1983). In "Mitochondria 1983" (R.J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds.), Walter de Gruyter, Berlin-New York, 179-189.
- De La Salle, H., Jacq, C., Slonimski, P.P. (1982). Cell 28, 721-732.
- Dujardin, G., Jacq, C., Slonimski, P.P. (1982). Nature 298, 628-632.
- Dujon, B. (1980). Cell 20, 185-197.
- Dujon, B. (1983). In "Mitochondria 1983" (R.J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds.), Walter de Gruyter, Berlin, New York, 259-268.

Earl, A.J., Turner, G., Croft, J.H., Dales, R.B.G., Lazarus, C.M., Lunsdorf, H., Küntzel, H. (1981). *Curr. Genet.* 3, 221-228.

Esser, K., Tudzynski, P., Stahl, U., Kück, U. (1980). *Mol. Gen. Genet.* 178, 213-216.

Farreilly, F., Butow, R.A. (1983). *Nature* 301, 296-301.

Gargouri, A., Lazowska, J., Slonimski, P.P. (1983). In "Mitochondria 1983" (R.J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds.), Walter de Gruyter, Berlin, New York, 259-268.

Garoff, H., Ansorge, W. (1981). *Anal. Biochem.* 115, 450-457.

Garriga, G., Lambowitz, A.M. (1984). *Cell* 38, 631-641.

George, D.G., Hunt, L.T., Dayhoff, M.O. (1983). In "Endocytobiology II" (H.E.A. Schenk, W. Schwemmler, eds.), Walter de Gruyter, Berlin, New York, 845-862.

Glotz, C., Brimacombe, R. (1980). *Nucl. Acids Res.* 8, 2377-2395.

Goldbach, R.W., Borst, P., Bollen-De Boer, J.E., Van Bruggen, E.F.J. (1978). *Biochem. Biophys. Acta* 521, 169-186.

Gray, M.W., Sankoff, D., Cedergren, R.J. (1984). *Nucl. Acids Res.* 12, 5837-5852.

Gray, M.W. (1983). *BioScience* 33, 693-699.

Grivell, L.A. (1983). *Scientific American* 248, 60-73.

Groot, G.S.P., Van Harten-Loosbroek, N. (1980). *Curr. Genet.* 1, 133-135.

Grunstein, M., Hogness, D.S. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3961-3965.

Guiso, N., Dreyfus, M., Siffert, O., Danchin, A., Spyridakis, A., Claisse, M., Slonimski, P.P. (1984). *EMBO J.* 3, 1769-1772.

Heckman, J.E., RajBhandary, U.L. (1979). *Cell* 17, 583-595.

Hensgens, L.A.M., Bonen, L., De Haan, M., Van der Horst, G., Grivell, L.A. (1983). *Cell* 32, 379-389.

Holl, J., Rödel, G., Schweyen, R.J. (1985). *EMBO J.*, in press.

Jacq, C., Pajot, P., Lazowska, J., Dujardin, G., Claisse, M., Groudinsky, O., de La Salle, H., Grandchamp, C., Labouesse, M., Gargouri, A., Guiard, B., Spyridakis, A., Dreyfus, M., Slonimski, P.P. (1982). In "Mitochondrial Genes" (P. Slonimski, P. Borst, G. Attardi, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 155-183.

Jacq, C., Banroques, J., Becam, A.M., Slonimski, P.P., Guiso, N., Danchin, A. (1984). *EMBO J.* 3, 1567-1572.

- Jacquier, A., Dujon, B. (1983). *Mol. Gen. Genet.* 192, 487-499.
- Kan, M.C., Gall, J.G. (1982). *Nucl. Acids Res.* 10, 2809-2822.
- Köchel, H.G., Küntzel, H. (1981). *Nucl. Acids Res.* 9, 5689-5696.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., Cech, T.R. (1982). *Cell* 31, 147-157.
- Labouesse, H., Slonimski, P.P. (1983). *EMBO J.* 2, 269-276.
- Lang, B.F., Ahne, F., Distler, S., Trinkl, H., Kaudewitz, F., Wolf, K. (1983). In "Mitochondria 1983" (R.J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds.), Walter de Gruyter, Berlin, New York, 313-329.
- Lang, B.F., Wolf, K. (1984). *Mol. Gen. Genet.* 196, 465-472.
- Lang, B.F. (1984). *EMBO J.* 3, 2129-2136.
- Lang, B.F., Ahne, F., Bonen, L. (1985). In press.
- Lazarus, C.M., Küntzel, H. (1980). In "The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome" (A.M. Kroon, C. Saccone, eds.), Elsevier, Amsterdam, 87-90.
- Lazowska, J., Jacq, C., Slonimski, P.P. (1980). *Cell* 22, 333-348.
- Lazowska, J., Jacq, C., Slonimski, P.P. (1981). *Cell* 27, 12-14.
- Lewin, R. (1983). *Science* 217, 921-922.
- Locker, J. (1979). *Anal. Biochem.* 98, 358-367.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Maxam, A.M., Gilbert, W. (1980). *Methods in Enzymologie* 65, 499-560.
- Messing, J. (1983). *Methods in Enzymologie* 101, 20-78.
- Messing, J., Vieira, J. (1982). *Gene* 19, 269-276.
- Michael, N.L., Rothbard, J.B., Shiurba, R.A., Linke, H.K., Schoolnik, G.K., Clayton, D.A. (1984). *EMBO J.* 3, 3165-3175.
- Michel, F., Dujon, B. (1983). *EMBO J.* 2, 33-38.

- Montoya, J., Gaines, G.L., Attardi, G. (1983). Cell 34, 151-159.
- Nobrega, F.G., Tzagoloff, A. (1980). J. Biol. Chem. 255, 9828-9837.
- Noller, H.F., Woese, C.R. (1981). Science 212, 403-411.
- Nomiyama, H., Sakaki, Y., Takagi, Y. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1376-1380.
- Osiewacz, H.D., Esser, K. (1984). Curr. Genet. 8, 299-305.
- Osinga, K.A., Tabak, H.F. (1982). Nucl. Acids Res. 10, 3617-3626.
- Osinga, K.A., De Vries, E., Van der Horst, G., Tabak, H.F. (1984). EMBO J. 3, 829-834.
- Perlman, P.S., Mahler, H.R., Dhawale, S., Hanson, D., Alexander, N.J. (1980). In "The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome" (A.M. Kroon, C. Saccone, eds.), Elsevier, Amsterdam, 161-172.
- Pillar, T., Lang, B.F., Steinberger, I., Vogt, B., Kaudewitz, F. (1983). J. Biol. Chem. 258, 7954-7959.
- Rigby, P.W., Dieckman, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977). J. Mol. Biol. 113, 237-251.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467.
- Sederoff, R.R. (1984). Advances in Genetics 22, 1-108.
- Slonimski, P.P., Claisse, M.L., Foucher, M., Jacq, C., Kochko, A., Lamouroux, A., Pajot, P., Perrodin, G., Spyridakis, A., Wambier-Kluppel, M.L. (1978). In "Biochemistry and Genetics of Yeast: Pure and Applied Aspects" (M. Bacila, B.L. Horecker, A.O.M. Stoppani, eds.), Academic Press, New York, 391-401.
- Sor, F., Fukuhara, H. (1982a). In "Mitochondrial genes" (P. Slonimski, P. Borst, G. Attardi, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 255-262.
- Sor, F., Fukuhara, H. (1982b). Nucl. Acids Res. 10, 1625-1632.
- Southern, E.M. (1975). J. Mol. Biol. 98, 503-517.
- Sriprakash, K.S., Clark-Walker, G.D. (1980). Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 186-193.
- Stiegler, P., Carbon, P., Ebel, J.P., Ehresmann, C. (1981). Eur. J. Biochem. 120, 487-495.

- Trinkl, H., Lang, B.F., Wolf, K. (1985). *Mol. Gen. Genet.* 198, 360-363.
- Tu, C.D., Cohen, S.N. (1980). *Gene* 10, 177-183.
- Turner, G., Earl, A.J., Greaves, D.R. (1982). In "Mitochondrial Genes" (P. Slonimski, P. Borst, G. Attardi, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 411-414.
- Tzagoloff, A., Macino, G., Sebald, W. (1979). *Ann. Rev. Biochem.* 48, 419-441.
- Van Knippenberg, P.H., Van Kimmenade, J.M.A., Heus, H.A. (1984). *Nucl. Acids Res.* 12, 2593-2604.
- Van Ommen, G.J.B., Groot, G.S.P., Grivell, L.A. (1979). *Cell* 18, 511-523.
- Wallace, D.C. (1982). *Microbiol. Rev.* 46, 208-240.
- Waring, R.B., Davies, R.W., Lee, S., Grisi, E., McPhail Berks, M., Scazzocchio, C. (1981). *Cell* 27, 4-11.
- Waring, R.B., Brown, T.A., Ray, J.A., Scazzocchio, C., Davies, R.W. (1984). *EMBO J.* 3, 2121-2128.
- Waring, R.B., Davies, R.W. (1984). *Gene* 28, 277-291.
- Waring, R.B., Ray, J.A., Edwards, S.W., Scazzocchio, C., Davies, R.W. (1985). *Cell* 40, 371-380.
- Weiss-Brummer, B., Rödel, G., Schweyen, R.J., Kaudewitz, F. (1982). *Cell* 29, 527-536.
- Weiss-Brummer, B., Holl, J., Rödel, G., Schweyen, R.J., Kaudewitz, F. (1983). *Cell* 33, 195-202.
- Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R., Noller, H.F. (1983). *Microbiol. Rev.* 47, 621-669.
- Wright, R.M., Horrum, M.A., Cummings, D.J. (1982). *Cell* 29, 505-515.
- Yaffe, M. (1983). In "Mitochondria 1983" (R.J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds.), Walter de Gruyter, Berlin, New York, 47-55.
- Zaug, A.J., Grabowski, P.J., Cech, T.R. (1983). *Nature* 301, 578-583.
- Zimmer, M., Lückemann, G., Lang, B.F., Wolf, K. (1984). *Mol. Gen. Genet.* 196, 473-481.

LEBENS LAUF

- 1958 geboren in München am 9. Juli
- 1964-1968 Volksschule in München
- 1968-1977 Gymnasium in München (math.-nat.)
- 1977 Abitur
- 1977-1978 Studium der Biologie an der Universität in Regensburg
- 1978-1982 Studium der Biologie an der Universität in München
- 1982 Diplomprüfung
- 1982-1983 Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München
- 1983-1985 Dissertationsarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München

